

Eve Karvinen

Oikeusgeneettinen kudosis- ja eritetyypitys RNA:n avulla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinööritoiminta

13.5.2016

Tekijä(t) Otsikko	Eve Karvinen Oikeusgeneettinen kudos- ja eritetyypitys RNA:n avulla
Sivumäärä Aika	44 sivua + 1 liite 13.5.2016
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaaja(t)	FT, dosentti Jukka Palo FT Minttu Hedman FM, lehtori Juha Eljas A. Knuuttila
<p>Insinööriä tehtiin Helsingin yliopiston Oikeuslääketieteen osaston Oikeusbiologian laboratoriossa. Laboratoriolla on pitkä kokemus oikeusgeneettisistä DNA-tutkimuksista, mutta RNA-tutkimus oli täysin uusi menetelmä laboratoriossa.</p> <p>RNA:lla on suuri merkitys geenien ilmentymisessä ja säätelyssä, ja sen avulla on mahdollista saada tarkempaa tietoa soluista ja niiden toiminnasta. RNA onkin tämän vuoksi kasvavan mielenkiinnon kohteena monilla aloilla, myös forensiikassa eli rikostutkinnassa ja oikeusgeneettisissä tutkimuksissa. DNA-tutkimuksista poiketen RNA-tutkimuksilla on mahdollista saada tietoa solujen ja täten myös näytteiden alkuperäkudoksesta. Tämä tieto voi olla ratkaisevassa merkityksessä rikostutkinnassa esim. raikaustapauksissa. RNA:han perustuvia kudos- ja eritetutkimuksia on julkaistu useita, mutta Suomesta menetelmä on puuttunut.</p> <p>Tämän työn tarkoituksena oli pystyttää menetelmä, jossa mRNA-merkkien avulla voidaan tunnistaa tyypillisimmät rikospaikkänäytteissä esiintyvät eritteet (veri, kuukautisveri, emätinerite/epiteelisolut, siemenneste, sylki ja iho). Kudostunnistus perustuu kudosspesifien RNA-merkkigeenien monistumiseen vain kohdekudoksessa. Näytteet kerättiin yhteistyössä HUS:n tutkijoiden ja lääkäreiden kanssa. Eristykseen käytettiin DNA/RNA-yhteiseristyskittiä, jolla sekä DNA että RNA voidaan eristää näytteestä samaan aikaan. RNA-eristeet käännettiin komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA), monistettiin tähän työhön valituilla RNA-merkeillä ja detektoitiin kapillaarielektroforeesilla. Työssä testattiin myös kvantitointimenetelmää RNA-eristeille. Osa DNA-eristeitä kvantitoitiin, ja osasta monistettiin DNA-profiili.</p> <p>Tulosten perusteella eristysmenetelmä oli herkkä ja toimiva käytetyille näytteille. Matriisikohtaiset PCR-reaktiot toimivat hyvin ja RNA:ta oli mahdollista monistaa myös muista kuin tuoreista näytteistä. Eristyksen hyvin matriiseista toimivat veri, kuukautisveri, emätinerite/epiteelisolut ja siemenneste. Kohtalaisen hyvin toimi myös sylki. DNA:ta saatiin eristettyä riittävästi suurimmasta osasta näytteistä. Lisää tutkimusta ja optimointia vaativat ihomatriisi sekä multiplex-reaktiot, joissa kaikkien kuuden matriisin RNA-merkit monistetaan yhdessä reaktiossa. Myös erilaisten olosuhteiden, kuten kankaiden ja kosmeettisten aineiden vaikutusta eritteisiin tulee tutkia tarkemmin.</p>	
Avainsanat	forensiikka, mRNA, RNA-menetelmäkehitys, kudostyyppitys, rikospaikkatutkinta

Author(s) Title Number of Pages Date	Eve Karvinen RNA-based identification of tissues and bodily secretions in forensics 44 pages + 1 appendix 13 May 2016
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Instructor(s)	Jukka Palo, PhD, Docent Minttu Hedman, PhD Juha Eljas A. Knuuttila, MSc, Senior lecturer
<p>The study was conducted in the Laboratory of Forensic Biology (Department of Forensic Medicine, University of Helsinki). The laboratory has a long experience in forensic DNA analyses, but RNA investigations are an entirely new method for the laboratory.</p> <p>RNA plays an important role in gene expression and regulation, and it can be analyzed to get more specific information about cells and their functions. For this reason, various fields of science (including crime scene investigation and forensic genetics) have shown increasing interest in RNA analyses. In contrast to the DNA analysis, RNA allows determining the origin of cells and thus the samples' origin tissue type. This information can have a major role in crime scene investigations, for example in rape cases. There are number of publications describing RNA-based identification of tissues and bodily secretions, but thus far this capability has been missing in Finland.</p> <p>The aim of this thesis was to set up a method for the mRNA-based identification of bodily fluids most commonly occurring in crime samples, i.e. blood, menstrual blood, vaginal mucosa, semen, saliva and skin. Identification is based on specific RNA marker genes which amplify only in their target tissue. Samples for this study were collected in collaboration with researchers and medical doctors of HUS. Extractions were performed with a DNA/RNA co kit, which allows simultaneous isolation of DNA and RNA from a single sample. RNA extracts were then reverse-transcribed into complementary DNA (cDNA), amplified with selected RNA markers and detected with capillary electrophoresis. The performance of RNA quantification methods were also examined. A subset of the DNA extracts were quantified and their DNA profiles amplified.</p> <p>According to the results, the extraction method was sensitive and workable for the investigated samples. Matrix-specific PCR reactions worked well, also with older samples. Blood, menstrual blood, vaginal mucosa and semen were the most functional matrices, also saliva worked rather well. Sufficient amounts of DNA were obtained for most of the samples. Further studies and optimization are needed in case of skin matrix and multiplex reactions aiming at simultaneous amplification of all RNA markers for the six matrices. The effect of various kinds of environmental factors on body fluid samples, such as different fabrics and cosmetics, should be researched more.</p>	
Keywords	forensic, mRNA, RNA method development, tissue typing, crime scene investigation

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Työn tausta ja tavoitteet	3
3	Materiaalit	5
3.1	Luvat	5
3.2	Näytteet	5
3.3	Laimennossarja	6
3.4	Aikasarja	7
4	Menetelmät	8
4.1	Eristys	8
4.2	RNA-kvantitointi	9
4.3	cDNA	10
4.4	PCR	10
4.5	Kapillaarielektroforeesi	13
4.6	Tulosten käsittely	13
4.7	DNA	13
5	Tulokset ja tulkinta	15
5.1	Eristys	15
5.2	RNA-kvantitointi	16
5.3	Kapillaarielektroforeesi RNA	19
5.3.1	GeneMapper-analyysit	19
5.3.2	Veri	20
5.3.3	Kuukautisveri	21
5.3.4	Emätinerite/ epiteelisolut	22
5.3.5	Siemenneste	24
5.3.6	Sylki	25
5.3.7	Iho	26
5.3.8	Laimennossarja	28
5.3.9	Aikasarja	30
5.3.10	Multiplex	31
5.3.11	Tulosten tulkinta kudostyyppin päättelemiseksi	34
5.4	DNA	36

5.4.1	DNA-kvantitointi	36
5.4.2	GlobalFiler	38
6	Yhteenveto	39
	Lähteet	41

Liite 1. Näytteen kulku kaaviona

Lyhenteet

cDNA	<i>Complementary DNA</i> . Komplementaarinen DNA
Forensiikka	Rikostutkinta ja oikeusgeneettinen tunnistustutkimus
EDNAP	The European DNA Profiling Group
EUROFORGEN-NoE	The European Forensic Genetics Network of Excellence
MMP	Matriksin metalloproteaasi
RFU	<i>Relative fluorescence unit</i> . Suhteellinen fluoresenssiyksikkö
RNAasi	Ribonukleaasi
18S-rRNA	Ribosomaalinen 18S-alayksikkö
STR	<i>Short tandem repeats</i> . Lyhyt peräkkäinen toistojakso

1 Johdanto

Forensisissä tutkimuksissa, eli rikostutkinnassa ja oikeusgeneettisissä yksilöntunnistustutkimuksissa, DNA:ta on hyödynnetty vuosia, ja sen avulla on mahdollista mm. identifioida ihmisiä joko vertaamalla näytteistä saatuja tuloksia suoraan keskenään tai sukulaisten vertailunäytteisiin. DNA:sta poiketen RNA-tunnisteet eivät ole erityisen käyttökelpoisia yksilöntunnistuksessa, mutta RNA-tutkimuksilla voidaan tehdä päätelmiä solujen ja täten myös näytteiden alkuperäkudoksesta. Tämä perustuu eri solutyypin välisiin eroihin geeniekspressiossa. Solujen kudostyyppien selvittämisellä voi olla ratkaiseva merkitys mm. raiskaus- ja rikospaikkatutkinnan onnistumiselle ja siten myös syyllisen tuomitsemiselle.

Ribonukleiinihappo (RNA) on molekyylinä samankaltainen deoksiribonukleiinihapon (DNA) kanssa, mutta niiden biologiset toiminnot eroavat toisistaan. Molekyyllitasolla niitä erottaa toisistaan RNA:n emäs urasiili, joka korvaa DNA:n tymiinin, RNA:n sokeriosa riboosi (DNA:ssa deoksiriboosi) sekä rakenne, jolla ne esiintyvät. DNA esiintyy yleisimmin kaksijuosteisena rakenteena, kun taas RNA on tavallisimmin yksijuosteinen. Molekyyllirakenteensa vuoksi RNA:n runko on herkempi murtumaan kuin DNA:n. RNA:n sokeriosan riboosin sisältämä hydroksyyli-ryhmä reagoi herkästi RNA:n oman fosfodiesterisidoksen kanssa, jolloin runko hajoaa. Tyypillinen eukaryoottisolun sisältää noin 15–30 pg RNA:ta. RNA:sta noin 95 % on ribosomaalista RNA:ta (rRNA), noin 3 % lähetti-RNA:ta (mRNA) ja loput 1–2 % ei-koodaava RNA:ta (tRNA, snRNA, miRNA jne.; eri RNA-tyypit. kts. taulukko 1). [1, s. 1–2.]

Taulukko 1. Eri RNA-lajit [2].

hnRNA	heteronuclear RNA	heteronukleaarinen RNA
rRNA	ribosomal RNA	ribosomaalinen RNA
mRNA	messenger RNA	lähetti-RNA
tRNA	transfer RNA	siirtäjä-RNA
miRNA	micro RNA	mikro-RNA
snRNA	small nuclear RNAs	pienet tumen RNA:t
snoRNA	small nucleolar RNAs	pienet tumajyväsien RNA:t
siRNA	small interfering RNAs	pienet häiritsevät RNA:t
stRNA	small temporal RNAs	pienet temporaaliset RNA:t

RNA:n tärkein biologinen funktio liittyy proteiinisynteesin moniin vaiheisiin. Transkriptiossa DNA:n emäsjärjestys kopioidaan mRNA:ksi. Translaatiossa mRNA:han kopioidun emäsjärjestyksen mukaan ribosomit liittävät tRNA:den kuljettamat aminohapot yhteen polypeptidiketjuiksi. Laskostumisen ja eri muokkausvaiheiden jälkeen polypeptidiketjuista syntyy valmiita proteiineja. Solujen genomista suuri osa käännetään RNA:ksi, mutta vain pieni osa siitä proteiineiksi [1, s. 1].

RNA:lla on suuri merkitys geenien ilmentymisessä ja säätelyssä, ja sen avulla on mahdollista saada tarkempaa tietoa soluista ja niiden toiminnasta. RNA onkin tämän vuoksi kasvavan mielenkiinnon kohteena monilla aloilla, myös forensiikassa. RNA:sta saatuja tuloksia on viime vuosina voitu hyödyntää esimerkiksi kudosten ja eritteiden tunnistamiseen. RNA-perusteinen kudostyyppin määrittäminen on menetelmä, jolle on selkeä tarve rikospaikkatutkinnassa ja raikaustapauksissa. Käytännössä RNA-tutkimuksessa pyritään vastaamaan kysymyksiin, mitä eritettä rikospaikalta löytynyt tahra on. Rikoksia selvittäessä on erittäin informatiivista tietää, onko esimerkiksi vereltä silmämääräisesti näyttävä tahra verta vai kuukautisverta.

RNA:n avulla tehtyjä kudosis- ja eritetyypitystutkimuksia on julkaistu useita, Euroopassa forensisia yhteistutkimuksia ovat julkaisseet EDNAP (The European DNA Profiling Group) sekä EUROFORGEN-NoE (The European Forensic Genetics Network of Excellence) [3; 4; 5; 6; 7; 8]. Tyypitykseen käytettävät menetelmät ja tulosten tulkinta pyritään saamaan entistä vakaimmiksi ja toistettaviksi, ja siten osaksi rikostutkintaa.

2 Työn tausta ja tavoitteet

Suomessa ei tällä hetkellä ole tietotaitoa forensiseen RNA-työskentelyyn ja kudostyyppien määrittämiseen. Aiemmin tehdyn tarvekartoituksen perusteella menetelmälle olisi tarvetta erityisesti poliisilla; yhä useammin esimerkiksi rikostutkimusten yhteydessä tarvittaisiin vastausta siihen, mistä kudoksesta tai eritteestä näyte on peräisin (Innovaatioprojekti: Oikeuslääketieteellisten RNA-tutkimusprojektien kartoitus ja valinta, Eve Karvinen, kevät 2015).

Yhtenä esteenä RNA-menetelmien kehittämiseksi on pidetty RNA:n hajoamisherkkyttä, joka vaikuttaa oleellisesti sen käsittelyyn laboratoriossa. Hajoamiseen keskeisesti vaikuttavia tekijöitä ovat pH, kaksiarvoiset positiivisesti varautuneet metalli-ionit sekä erityisesti ribonukleasit. Pitkänkin DNA-laboratoriokokemuksen omaavan henkilön on tiedostettava ja ymmärrettävä hajoamiseen liittyvät haasteet. Käytetyissä reagensseissa ja liuoksissa hajoamista voidaan estää oikeanlaisella pH:lla sekä metalloproteinaasi-inhibiittoreilla. Näistä ribonukleasit eli RNAasit ovat haastavimpia. RNAaseja on kaikkialla ympäristössä mm. ilmassa, pölyssä, bakteereissa ja iholla. RNAaseja on erittäin vaikeata tuhota, joten laboratoriotyöskentelylle tulisi mahdollisuuksien mukaan varata aivan oma tilansa ja välineistönsä, sekä käytettävien materiaalien tulisi olla mieluiten RNAasi-vapaita. [1, s. 2–4.]

Tämän insinööriyön tarkoituksena oli pystyttää menetelmä kudosten ja eritteiden tyyppitystä varten, sekä selvittää mRNA-merkkien kykyä tunnistaa seuraavat kudokset ja eritetypit:

1. veri
2. kuukautisveri
3. emätinerite/-epiteeli
4. siemenneste
5. sylki
6. iho.

Kyseiset matriisit valikoituivat tutkimuksen kohteeksi, koska niistä löytyy paljon aiemmin julkaistua tietoa ja ne myös kattavat melko hyvin rikostutkinnassa esiintyvät eritteet. Tutkimuksessa oli tarkoitus saada eristettyä yhdestä näytteestä samanaikaisesti sekä DNA että RNA. Tämä on ratkaisevaa, koska usein pienivolyymisestä ja/tai laadultaan heikosta näytteestä voidaan näin määritellä sekä kudostyyppi ja yksilöivä DNA-tunniste. Alkuperäisen näytteen jakaminen kahteen osaan eri eristyksiä varten voi johtaa siihen, että osa arvokkaasta näytteestä menetetään. Tutkimukseen valittiin 2–4 erite-/kudostyyppin RNA-merkkiä sekä ylläpitogeneeni-kontrollimerkki (housekeeping). Lähtökohtana merkkien valinnalle sekä käytetyille työvaiheille olivat aiemmat julkaistut tutkimukset. Koska aikaisempaa kokemusta kyseisistä tutkimuksista ei ollut eikä Suomessa ole vertaistahoa, kaikki pohjatieto etsittiin julkaistusta aineistosta.

Julkaistussa aineistossa esiintyi ristiriitaisia tietoja eri laboratoriotyövaiheista ja myös käytettävistä RNA-merkeistä. Tähän työhön käytetyt merkit valittiin sillä lähtöajatuksella, että niitä on mahdollista muuttaa tai jättää pois omien tutkimustulosten perusteella. Työvaiheet toteutettiin siten, että ne soveltuvat akkreditoidun laboratorion työskentelytapoihin ja että menetelmä olisi mahdollista validoida osaksi laboratorion maksupalvelutoimintaa. Tulosten luotettavuutta varmistettiin mm. käyttämällä riittävästi kontrollinäytteitä. Täydellistä validointia ei tässä työssä ollut tarkoitus suorittaa.

3 Materiaalit

Tutkimukseen tarvittavat näytteet kerättiin yhteistyössä HUS:n tutkijoiden ja lääkäreiden kanssa.

3.1 Luvat

Lääketieteellisestä tutkimuksesta annettu laki koskee myös ihmisestä otettujen veri- ja kudoksenäytteiden tutkimusta. Tätä tutkimusta ja näytteiden keräystä varten haettiin tutkimuslupa HUS:n koordinoivalta eettiseltä toimikunnalta (lupanumero 201/13/03/00/2015). Lupaa varten toimikunnalle tuli toimittaa mm. tutkimussuunnitelma, tutkittavan tiedote- ja suostumuslomakkeet sekä lista tutkimukseen osallistuvista henkilöistä. Tutkimusluvan lisäksi HUS:n tutkijat hakivat HUS:lta erillisen klinikkaluvan näytteidenottoa varten.

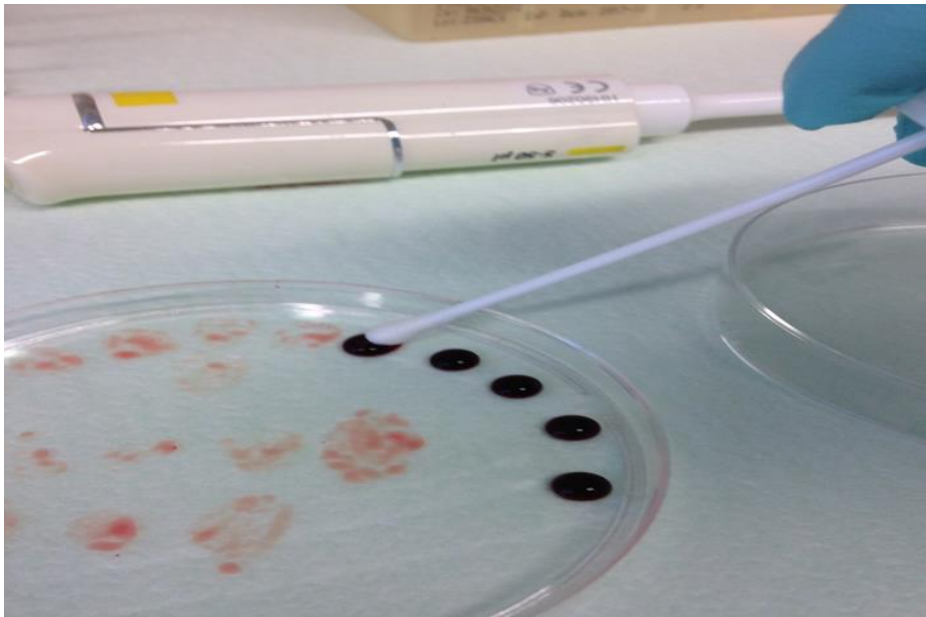
3.2 Näytteet

Näytteitä luovuttivat HUS:n vapaaehtoiset potilaat, henkilökunta sekä Oikeusbiologian laboratorion henkilökunta. Kukin luovuttaja sai tiedotteen näytteiden käyttötarkoituksesta ja allekirjoitti tietoon perustuvan suostumuksen tutkimukseen osallistumisesta. Näytteet anonymisoitiin heti keräyksen jälkeen, ja tutkimuksen ajan ne esiintyivät ainoastaan numerokoodeilla.

Kaikki näytteet taltioitiin steriileihin pumpulipuikkoihin. Tämän tarkoitus oli säilyttää näytteet mahdollisimman autenttisina sekä jäljitellä rikospaikkänäytteiden taltiointia. Samasta syystä esimerkiksi verinäytteet otettiin putkiin, jotka eivät sisältäneet säilöntä- tai käsittelyaineita. Verinäytteet otettiin joko sormenpäästä tai avoneulalla steriiliin putkeen. Sormenpäästä saatu verinäyte imeytettiin suoraan pumpulipuikkoon vältellen ihokosketusta, verisuonesta otettu verinäyte puolestaan pipetoitiin maljalle ja imeytettiin siitä pumpulipuikkoon (Kuva 1). Kuukautisverinäytteet otti kukin vapaaehtoinen luovuttaja itse pumpulipuikkoon joko emättimestä tai tamponista. Lääkärit ottivat emätinnäytteet potilailta pumpulipuikkoihin muiden tutkimusten yhteydessä. Siemennestenäytteistä HUS:n henkilökunta erotteli pienet erät steriileihin putkiin tätä tutkimusta varten. Näytteistä pipetoitiin maljalle pisarat, jotka imeytettiin

pumpulipuikkoihin. Emätin- ja siemennestenäytteitä luovuttaneilta kerättiin samalla myös sylki- ja ihonäytteet. Sylkinäytteet otettiin kastamalla pumpulipuikkoa kielen päällä, ja ihonäytteet opastettiin ottamaan pyörittelemällä pumpulipuikkoa luovuttajan kyynärtaipeessa.

Näytteet pakastettiin välittömästi keräyksen jälkeen ja säilytettiin -20 asteessa.



Kuva 1. Verinäytteiden siirtoa pumpulipuikkoihin.

3.3 Laimennossarja

Laimennossarja tehtiin veri-, sylki- ja siemennestenäytteille. Sarjalla pyrittiin määrittelemään, kuinka pienestä määrästä on mahdollista saada eristettyä RNA:ta ja DNA:ta. Laimennossarjaan valittiin kaksi veri- ja sylkinäytettä, toinen näytteistä mies- ja toinen naisluovuttajalta. Myös siemennestenäytteitä valittiin kaksi. Näistä näytteistä toinen oli normaali siemennestenäyte ja toinen näyte oli henkilöltä, jolle oli suoritettu vasektomia, eikä näyte sisältänyt siittiöitä.

Näytteistä pipetoitiin 0,5 µl, 1 µl, 5 µl sekä 10 µl steriilille maljalle, josta ne imeytettiin pumpulipuikkoihin. Näytteille suoritettiin DNA/RNA-eristys samana päivänä, jolloin ne oli imeytetty puikkoihin.

3.4 Aikasarja

Aikasarjalla haluttiin selvittää, kuinka nopeasti näytteissä oleva RNA hajoaa analyysikelvottomaksi. Sarja tehtiin kahdelle veri- ja kahdelle siemennestenäytteelle. Verinäytteistä toinen oli peräisin mieheltä ja toinen naiselta. Siemennestenäytteistä toinen oli normaali siemennestenäyte ja toinen peräisin henkilöltä, jolle oli suoritettu vasektomia.

Aikasarjaa varten näytteistä pipetoitiin 5 µl:n pisarat puhtaalle maljalle. Maljat sijoitettiin avonaisina toimistuhuoneen hyllylle. Pisaroista käytiin taltioimassa näytteet vedellä kostutetuilla pumpulipuikoilla kahden tunnin (2 h), yhden päivän (1 pv), kahden päivän (2 pv) sekä viiden päivän (5 pv) kuluttua. DNA/RNA-eristys tehtiin välittömästi pumpulipuikkoihin imeyttämisen jälkeen.

4 Menetelmät

Menetelmän pystytys sisälsi lupahakuprosessin näytteiden keräystä varten, näytteiden keräyksen, RNA:n ja DNA:n eristuksen näytteistä, eristeiden kvantitoinnin, eristeiden käännön komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA), PCR-alukkeiden valinnan, PCR-reaktiot leimattujen alukkeiden avulla, fragmenttien erottelun kapillaarielektroforeesilla sekä tulosten analysoinnin. Näytteiden kulku on esitetty kaaviona Liitteessä 1.

4.1 Eristys

Eristykseen käytettiin AllPrep DNA/RNA Mini -kittiä (QIAGEN), jolla on mahdollista eristää sekä DNA että RNA näytteestä samanaikaisesti ilman näytteen jakamista. Eristyskitin toiminta perustuu puskuriliuoksiin sekä kolonnien kalvoihin. Ensimmäisessä vaiheessa näytteen solut hajotetaan ja homogenisoidaan denaturoivan korkean suolapitoisuuden omaavan puskurin avulla (RLT-buffer). Puskuri myös inaktivoi näytteessä olevat DNAasit sekä RNAasit. Ensimmäisen kolonnin (AllPrep DNA spin column) kalvo sitoo yhdessä korkean suolapitoisuuden kanssa DNA:n. Läpi tulleeeseen supernatanttiin lisätään etanolia, jonka avulla RNA sitoutuu sille tarkoitetun kolonnin (RNeasy spin column) kalvoon. Pesuvaiheiden jälkeen DNA/RNA eluoidaan kalvoistaan, lopullinen tilavuus DNA-eristeelle on 100 µl, ja RNA-eristeelle 30 µl. Kitin on patentoitu, joten liuosten tarkkoja koostumuksia ei ole kerrottu.

Eristyksessä noudatettiin kitin omaa ohjetta lukuun ottamatta alun inkubaatiovaiheita. Julkaisuissa esiintyi vaihtelevia käytäntöjä inkubaatioissa käytettyjen reagenssien ja niiden volyymien, lämpötilan sekä ajan suhteen. Tässä työssä testattiin verinäytteillä joitakin julkaistuja menetelmiä, ja selvitettiin niiden vaikutusta saatuihin tuloksiin. Eristykseen testattiin myös Nucleospin RNA -kittiä (Macherey-Nagel), joka on tarkoitettu pelkästään RNA:n eristykseen. (Taulukko 2) Tämän testin tarkoituksena oli selvittää, onko RNA-saanto parempi RNA:n eristykseen tarkoitetulla kitillä verrattuna kittiin, jossa sekä DNA että RNA eristetään samasta näytteestä.

Taulukko 2. Eri inkubaatio-olosuhteita.

Lähtömateriaali	Reagenssit	Lämpötila	Aika
Veripisara sormenpäästä	500 µl RLT-Buffer	huoneenlämpö	45 min
50 µl verta	500 µl RLT-Buffer	huoneenlämpö	2 h
50 µl verta	500 µl RLT-Buffer	+ 56 °C	2 h
50 µl verta	500 µl RLT-Buffer + 10 µl Proteinaasi-K	+ 56 °C	2 h
50 µl verta	500 µl RLT-Buffer	+ 56 °C	3 h
50 µl verta	500 µl RLT-Buffer + DNase	+ 56 °C	3 h
50 µl verta	500 µl RLT-Buffer + Proteinaasi-K + DNase	+ 56 °C	3 h
50 µl verta	NucleoSpin RNA Kit	huoneenlämpö	30 min

Eristykset tehtiin RNA:lle varatuin välinein erillisessä laminaarikaapissa. Inkubaatiotestien jälkeen näytteet eristettiin AllPrep DNA/RNA Mini -kitillä. Pumpulipuikkojen päät katkaistiin 1,5 ml:n putkiin, lisättiin 500 µl eristyskitin RLT-puskuria, ja inkuboitiin 45 minuuttia huoneenlämmössä. Eristyksissä oli mukana eristysreagenssien puhtauden varmistamiseksi negatiivi-kontrollit (ER-0). RNA-eristeet pakastettiin heti eristuksen valmistuttua -70 asteeseen, ja säilytettiin jäällä pakastuksen ulkopuolella käsiteltäessä.

4.2 RNA-kvantitointi

BioAnalyzer-laitteella (Agilent) määritettiin eristeen RNA-konsentraatio eli kvantitoitiin RNA-eriste käyttämällä Agilentin RNA Nano- ja RNA Pico -kittejä. Määritys perustuu elektroforeesiin, ja laitteella voidaan määrittää tuotteen pitoisuus sekä eheys. Määritys tapahtuu levyllä (chip), jonka kaivot täytetään geeli-väriaineseoksella. Kaivoihin lisätään kokostandardi sekä näytteet sisäisen standardin kanssa. Jokaiselle näyttekaivolle on oma sähkövirtaan yhdistetty elektrodinsa, ja näytteen fragmentit erottuvat kokonsa perusteella. Laitteen analyysiohjelma suorittaa pitoisuuslaskelmat kokostandardin ja sisäisen standardin perusteella. Eheyttä kuvataan RIN-arvolla (RNA integrity number), joka määritetään ribosomaalisten 28S/18S-alayksiköiden konsentraatioiden perusteella. RNA Nano -kitin määritysalue on 25–500 ng/µl (totaali RNA) ja RNA Pico -kitin 50–5000 pg/µl (totaali RNA).

4.3 cDNA

RNA-eristeen sisältämä RNA käännettiin käänteistranskriptiolla komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA). Kääntämiseen käytettiin High Capacity RNA to cDNA -kittiä (Life Technologies), ja reaktiot tehtiin kitin ohjeiden mukaisesti. Reaktiossa on lyhyitä ns. *random*-heksameeri -alukkeita, joilla voidaan käyttää templaattina solun koko RNA-populaatiota. Reaktio pystytettiin RNA:lle varatussa laminaarikaapissa, ja reagenssit sekä eristeet pidettiin jäällä pystytyksen ajan. Reaktion lopputilavuus oli 20 µl ja eristettä siihen käytettiin 5 µl. Reaktioissa oli mukana negatiivi-kontrollit (RT-), joiden avulla havaitaan näytteen mahdollinen DNA-kontaminaatio.

4.4 PCR

PCR-reaktioissa käytettävät alukkeet valittiin julkaisujen perusteella [8; 9; 10; 11; 12]. Valintaan vaikutti osittain myös monistettavan tuotteen koko. Kaikki 19 merkkiä ovat kooltaan melko pieniä, 60–200 emäsparin mittaisia, joilla on parempi monistumistodennäköisyys heikkolaatuisista näytteistä. Vaikkakin PCR-reaktiot suoritettiin alkuun matriisikohtaisina, suunnitelmat tehtiin siten, että PCR olisi mahdollista tehdä myös kaikkien käytävien merkkien multiplex-reaktiona. Merkkien väliin pyrittiin jättämään vähintään 5 emäsparia, ja lisäksi alukkeet leimattiin erilaisilla fluoresoivilla väreillä.

Alukkeiden lisäksi PCR-reaktioissa käytetyt komponentit ja niiden pitoisuudet reaktioissa olivat nukleotidit 0,2 mM (Labnet), 10xBuffer II 1x (Applied Biosystems), MgCl₂ 3mM (Applied Biosystems), TaqGold 1,5U (Applied Biosystems) sekä vesi. Reaktion lopputilavuus oli 25 µl ja cDNA:ta siihen käytettiin 3 µl. Sisäisenä kontrollina käytettiin housekeeping-geeniä 18S-rRNA, jonka avulla saadaan tietoa eristyksen onnistumisesta sekä PCR-reaktion toimivuudesta. PCR-reagenssien puhtauden varmistamiseksi mukana olivat negatiivi-kontrollit (PCR-0). Reaktiot tehtiin MJ Reseach PTC-220 PCR-laitteella (Bio-Rad), käytetty PCR-ohjelma on esitetty kuvassa 2.

25x	95 °C	11 min
	94 °C	20 s
	57 °C	+0,2 °C/sykli, 30s
	72 °C	40 s
	72 °C	60 min

Kuva 2. PCR-ohjelma

PCR-reaktioita optimoitiin testaamalla komponenttien eri konsentraatioita sekä muuttamalla PCR-ohjelman syklien määrää. Alukkeiden konsentraatioiden optimointi osoittautuikin haastavaksi. Konsentraatio vaikuttaa monistuvan fragmentin vahvuuteen eli analysoitavien piikkien korkeuksiin kapillaarielektroforeesijossa, ja saatujen piikkien korkeuksien perusteella määriteltiin hyväksyttävien piikkien raja-arvot. Tavoitteena oli saada mahdollisimman tasavahvat tulokset: liian vahvat piikit heikentävät muiden monistumista, sekä ne havaitaan myös toisissa väreissä, kun taas liian heikot piikit jäävät alle määritysrajan. PCR-reaktioissa käytetyt merkit, alukkeiden leimat, teoreettiset koot, alukkeiden konsentraatiot sekä käytetyt lähteet, joista alukkeiden sekvenssit poimittiin, on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. PCR-reaktioissa käytetyt RNA-merkit.

	Merkki	Leima	Koko (bp)	C (μM)/PCR	Lähde
Veri	HBB	6FAM	61	0,03	[9]
	HBA	6FAM	112	0,03	[11]
	CD93	6FAM	151	0,9	[9]
Kuukautisveri	MMP10	VIC	107	0,2	[8, 12]
	MMP7	PET	126	0,7	[9]
	LEFTY2	VIC	130	0,7	[10]
Emätin	HBD1	6FAM	101	0,8	[9]
	MUC4	PET	141	0,6	[9]
	CYP2B7P1	VIC	146	0,3	[8]
Siemenneste	PRM1	PET	91	0,1	[9]
	SEMG1	6FAM	121	0,9	[9]
Sylki	STATH	6FAM	93	0,4	[9]
	HTN3	6FAM	134	0,03	[9]
	SMR3B	6FAM	147	0,7	[10]
	MUC7	6FAM	197	0,2	[10]
Iho	CDSN	6FAM	71	0,5	[9]
	LOR	VIC	89	0,5	[9]
	LCE1C	VIC	99	0,5	[8]
Ylläpitogeeni-kontrolli	18S-rRNA	PET	110	0,01	[9]

Matriisikohtaisten PCR-reaktioiden lisäksi testattiin muutamilla näytteillä 19 alukeparin multiplex-reaktioita. Multiplex-reaktion etuna on, että tutkitusta eritteestä voitaisiin testata kaikkien kuuden matriisin merkkien monistuvuus yhdessä reaktiossa; tämä soveltuisi erityisesti useamman eritteen sekanäytteille, joita rikospaikkänäytteissä todennäköisesti on. Multiplex-testauksessa alukkeista valmistettiin seos laskemalla konsentraatiot siten, että lisäämällä reaktioon 10 μl seosta saatiin reaktion lopullisiksi alukekonsentraatioiksi samat konsentraatiot kuin matriisikohtaisissa PCR-reaktioissa (Taulukko 3). Muut komponentit ja olosuhteet olivat yhtäläiset matriisikohtaisten PCR-reaktioiden kanssa.

4.5 Kapillaarielektroforeesi

PCR-tuotteet puhdistettiin sitoutumattomista leimoista ennen kapillaarielektroforeesiajtoa MinElute -kitillä (QIAGEN) kitin ohjeen mukaisesti.

Monistetut fragmentit eroteltiin kapillaarielektroforeesilaitteella (Genetic Analyzer 3500XL, Applied Biosystems), ja detektoitiin fluoresoivien leimojen avulla laserilla. Menetelmässä negatiivisesti varautuneet fragmentit kulkevat kokonsa mukaisessa järjestyksessä silikapolymeerillä täytetyssä kapillaarissa, jonka päiden välille on sähkövirran avulla muodostettu jännite-ero. Fragmenttien laserin virittämät leimat detektoidaan kapillaarin anodipäässä UV/Vis-detektorilla. Perinteiseen agarosigeelielektroforeesiin verrattuna menetelmä on huomattavasti herkempi ja tarkempi, ja sillä voidaan erotella fragmentteja jopa 0,5 emäsparin erolla.

Ajtoa varten pipetoitiin 1 µl puhdistettua PCR-tuotetta 12,5 µl:aan formamidi-kokostandardiseosta. Kokostandardina käytettiin LIZ-500®-molekyyylimarkkeria (Life Technologies). Ajo-olosuhteet: G5-värisetti (6-FAM™, VIC®, NED™, PET®, LIZ®), injektioaika 20 s, injektiojännite 1,2 kV, ajojännite 15 kV, uunin lämpötila 60 °C ja ajoaika 1210 s.

4.6 Tulosten käsittely

Kapillaarielektroforeesiajosta saatu raakadata käsiteltiin GeneMapper® ID-X v. 1.4 -ohjelmistolla (Applied Biosystems). Fragmenttien koko poikkesi teoreettisista arvoista, joten analyysiparametrien bin- ja panel-setit määriteltiin saatujen tulosten perusteella. Hyväksyttävien piikkien alarajana käytettiin arvoa 100 RFU.

4.7 DNA

Koska tämän työn tarkoituksena ei ollut keskittyä DNA:n eristämiseen, mikä pohjatietojen valossa on ongelmallista, ainoastaan osa DNA-eristeistä analysoitiin tuloksiin asti. DNA:n analysointiin käytettiin näytteitä kustakin matriisista sekä laimennos- ja aikasarjasta.

DNA-profiilien monistamiseen käytettiin laboratorion akkreditoitua yksilöntunnistusmenetelmää, jossa monistus tehdään AmpFISTR GlobalFiler Express® -kitillä (Applied Biosystems). Kitti sisältää 21 yksilöntunnistus STR-merkkiä (single tandem repeats) ja 3 sukupuolta indikoivaa merkkiä (AMEL, Y-indel ja DYS391). Merkit kattavat Euroopassa yleisimmin käytetyt yksilöntunnistusmerkit (nk. European Standard Set, I. ESS). Monistetut DNA-fragmentit analysoitiin kapillaarielektroforeesilla (Genetic Analyzer 3500 XL, Applied Biosystems), ja tulokset käsiteltiin GeneMapper® ID-X v. 1.4 -ohjelmistolla (Applied Biosystems).

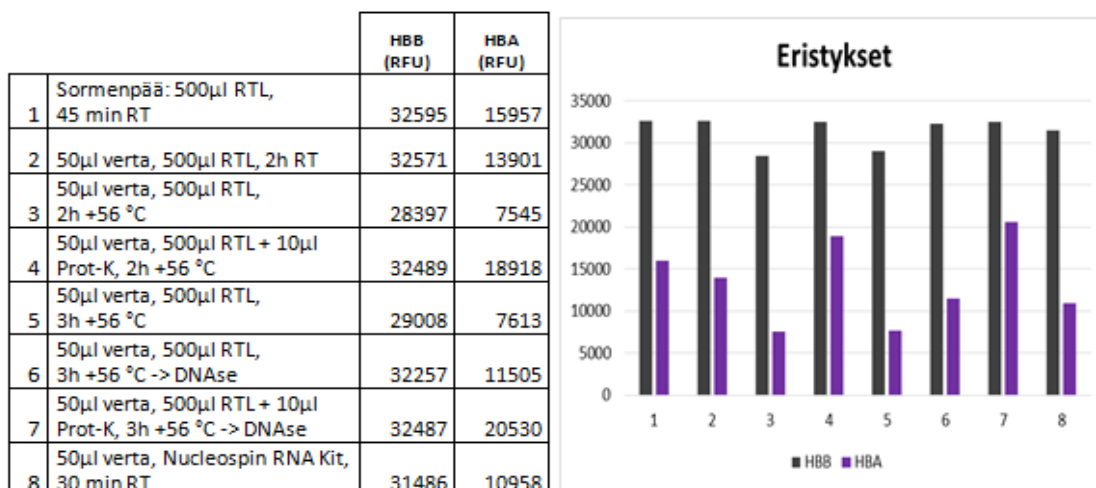
Osa näytteistä kvantitoitiin eristeen DNA-konsentraation määrittämiseksi Quantifiler® Human DNA Quantification -kitillä (Applied Biosystems) kvantitatiiviseen reaaliaikaiseen PCR:ään perustuvalla menetelmällä. Analysointiin käytettiin ABI7500 Real-Time PCR -laitetta (Applied Biosystems).

5 Tulokset ja tulkinta

5.1 Eristys

Tässä työssä eristykseen käytetty AllPrep DNA/RNA Mini -kitti osoittautui käyttökelpoiseksi eristysmenetelmäksi. Rajoittavana tekijänä voidaan pitää kerralla eristettävien näytteiden pienehköä määrää. Eristys sisältää monta eri sentrifugointi- ja pesuvaihetta, joten näytteitä ei kannata tehdä kerrallaan kovin montaa, koska niiden seisotusajat venyvät melko pitkiksi. Pitkät seisotusajat voivat RNA:n hajoamisherkkyyden vuoksi heikentää eristeen laatua.

Inkubaatioajan tai -lämpötilan noston ei nähty parantavan RNA-saantoa. Kaikista eri olosuhteissa inkuboiduista sekä toisella kitillä eristetyistä näytteistä saatiin erittäin vahvat tulokset, jopa niin vahvat että tuotteita jouduttiin laimentamaan ennen luettavien kapillaarielektroforeesipiikkien saamista. Koska inkubaatio-olosuhteita vertaavassa eristystestissä käytetyt näytteet olivat verinäytteitä, niistä monistettiin kahta verimerkkiä (HBB ja HBA). Kapillaarielektroforeesilla saatujen piikkien korkeudet (RFU) verrattuna eri inkubaatio-olosuhteisiin ja RNA-kittiin on esitetty kuvassa 3.



Kuva 3. Eri inkubaatio-olosuhteiden tuloksia.

Testatuista inkubaatio-olosuhteista tehokkaimmaksi osoittautui inkubaatio RLT-puskurissa 45 minuuttia huoneenlämmössä. Lähtömateriaalina käytettiin sormenpäästä otettua veripisaraa, joka on noin kymmenkertaisesti pienempi määrä, kun muissa testeissä käytetystä 50 µl:n veripisarasta. Lähtömateriaalin määrästä huolimatta verimerkit monistuivat lähes saman vahvuisina.

Joissakin julkaisuissa on epäilty DNA/RNA-yhteiseristyskittien tehokkuutta RNA-eristyksessä [13]. Tässä työssä testatulla pelkän RNA:n eristämiseen tarkoitettu Nucleospin RNA -kittiä ei voitu osoittaa yhteiseristyskittiä huonommaksi vaihtoehdoksi; tulokset olivat hyvin samankaltaiset.

5.2 RNA-kvantitointi

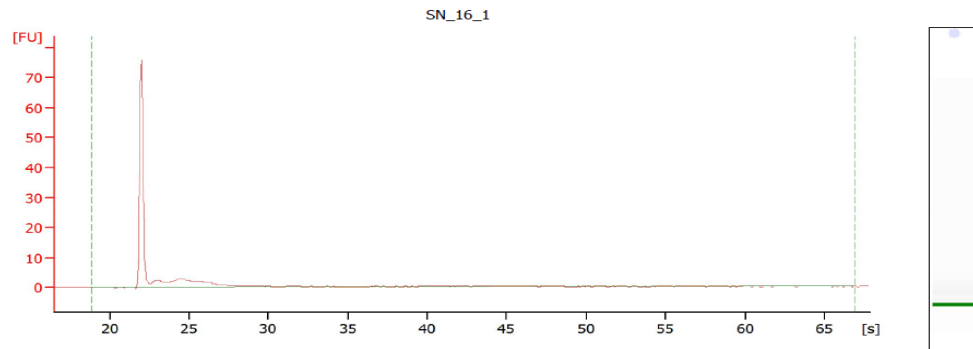
Mikäli eristeen sisältämä RNA-konsentraatio on tiedossa, voidaan jatkoreaktiot etukäteen optimoida konsentraation mukaisesti. Tämä helpottaa tasalaatuisten tulosten saamista sekä vähentää tarvittavien uusintareaktioiden määrää. Tässä työssä kvantitointiin käytettiin BioAnalyzeria sekä kahta kvantitointikittiä.

Suurin osa eristeistä sisälsi RNA:ta useimpien kvantitointikittien määrittämisrajaa vähemmän. Kvantitointi aloitettiin RNA Nano -kitillä, jonka määrittämisalue on 25–500 ng/µl (totaali RNA). Saatujen tulosten mukaan testatuissa eristeissä ei ollut lainkaan RNA:ta. Tämä hidasti alkua melkoisesti, koska syyksi epäiltiin eristystä. Kvantitointiin kokeiltiin seuraavaksi RNA Pico -kittiä, jonka määrittämisraja on alhaisempi (50–5000 pg/µl, totaali RNA). Tämäkin kitti antoi usein tulokseksi sen, ettei eristeessä ollut RNA:ta, tai että sitä oli siellä hyvin vähän, ja lähes sama määrä kuin eristysen negatiivikontrollissa (Kuva 4).

Assay Class: Eukaryote Total RNA Pico
 Data Path: D:\...Eukaryote Total RNA Pico_DE13804738_2015-11-03_19-27-04.xad

Created: 11/3/2015 7:27:03 PM
 Modified: 11/3/2015 7:49:06 PM

Electropherogram Summary Continued ...



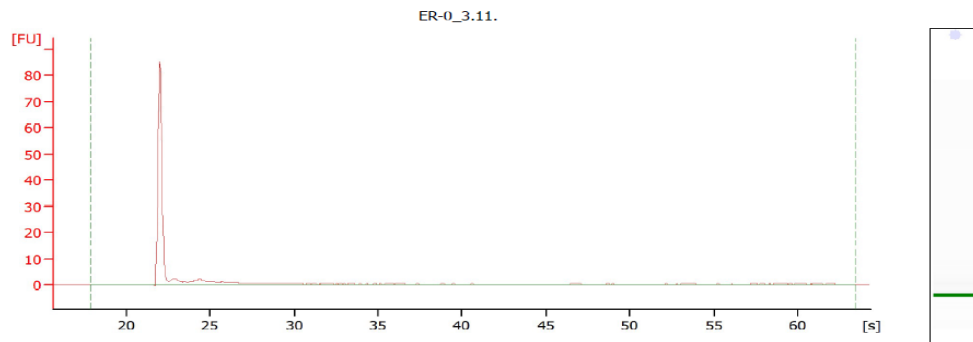
Overall Results for sample 11 : SN_16_1

RNA Area:	47.2	RNA Integrity Number (RIN):	1 (B.02.08)
RNA Concentration:	45 pg/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0.0	Result Flagging Label:	RIN:1

Assay Class: Eukaryote Total RNA Pico
 Data Path: D:\...Eukaryote Total RNA Pico_DE13804738_2015-11-04_14-12-30.xad

Created: 11/4/2015 2:12:30 PM
 Modified: 11/4/2015 2:35:28 PM

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 3 : ER-0_3.11.

RNA Area:	35.3	RNA Integrity Number (RIN):	1 (B.02.08)
RNA Concentration:	30 pg/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0.0	Result Flagging Label:	RIN:1

Kuva 4. Kvantitointitulokset siemennestenäytteelle (SN_16) ja eristysnegatiivikontrollille (ER-0) (BioAnalyzer).

Näistä kvantitointituloksista huolimatta näytteiden analysointia jatkettiin. Esimerkiksi tutkitusta siemennestenäytteestä (SN_16) monistui vahvat tulokset siemennestemerkeillä PRM1 ja SEMG1 sekä 18S-rRNA-merkillä, eikä eristysnollanäytteessä monistunut piikkejä. Tämän perusteella alle määritysrajan olevaa alhaista tulosta ei voida pitää luotettavana (Kuva 5).



Kuva 5. Kapillaarielektroforeesitulokset kuvassa 4 oleville näytteille.

Ainoastaan joistakin erittäin vahvoista näytteistä saatiin RNA Pico -kitin määritysalueelle osuva määrä RNA:ta. Ottaen huomioon esimerkiksi rikosnäytteiden mahdollisesti huonon laadun sekä niiden pienen volyymin ei voida olettaa, että ne sisältäisivät näiden kittien edellyttämän määrän RNA:ta. Tästä syystä tätä käytettyä kvantitointimenetelmää ei voida pitää käyttökelpoisena tämän kaltaisille näytteille.

5.3 Kapillaarielektroforeesi RNA

5.3.1 GeneMapper-analyysit

Matriisikohtaisten kapillaarielektroforeesitulosten perusteella määriteltiin GeneMapper-ohjelmalle bin- ja panel-arvot. Näiden arvojen laskemiseen käytetyt koot, niiden keskihajonta sekä käytettyjen tulosten lukumäärä on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. Bin- ja panel-arvojen laskemisessa käytetyt kapillaarielektroforeesitulokset.

	Merkki	n	Keskiarvo (bp)	Keskihajonta
Veri	HBB	66	55,5	0,2
	HBA	64	109,0	0,3
	CD93	26	147,6	0,1
Kuukautisveri	MMP10	30	103,6	0,4
	MMP7	29	125,0	0,4
	LEFTY2	24	125,7	0,2
Emätin	HBD1	20	98,0	0,1
	MUC4	24	140,1	0,1
	CYP2B7P1	31	145,8	0,2
Siemenneste	PRM1	32	90,5	0,4
	SEMG1	38	117,2	0,2
Sylki	STATH	26	90,5	0,1
	HTN3	25	130,7	0,1
	SMR3B	26	144,1	0,1
	MUC7	26	193,5	0,1
Iho	CDSN	9	65,0	0,1
	LOR	11	84,2	0,1
	LCE1C	10	93,7	0,1
Ylläpitogeeni-kontrolli	18S-rRNA	162	112,4	0,2

Kapillaarielektroforeesipiikkien korkeuden alarajana käytettiin arvoa 100 RFU. Yli 20000 RFU olevat piikit alkavat saturoitua ja hankaloittavat tulosten tulkintaa, joten ne on laimennettava ennen luettavien tulosten saamista. Monistettujen fragmenttien koko eroaa teoreettisista arvoista (Taulukko 3.). Tähän vaikuttavat mm. alukkeessa käytetty leima, sekä sekvenssissä olevien emästen suhde. Osa merkeistä osoittautuikin melko samankokoisiksi, mikä saattaa vaikeuttaa multiplex-reaktioiden tulkintaa.

Se että CD93 ei monistu kaikista näytteistä, ei tee merkistä periaatteessa epäluotettavaa, koska näytteeseen ei välttämättä valikoidu valkosoluja niiden vähyyden takia. Koska tulosten luotettavuuden kannalta käytettyjä merkkejä tulisi ehkä olla enemmän kuin kaksi, voidaan kuitenkin pohtia, olisiko CD93:n tilalle olemassa joku tehokkaammin monistuva merkki erittäin herkästi verta indikoivien HBB:n ja HBA:n lisäksi.

5.3.3 Kuukautisveri

Kuukautisverinäytteistä monistettiin neljä merkkiä yhteisreaktiossa. Käytetyt merkit olivat MMP10, MMP7 ja LEFTY2 sekä kontrollimerkki 18S-rRNA (Kuva 7).



Kuva 7. Kapillaarielektroforeesitulos kuukautisverinäytteelle.

MMP10 (stromelysin-2, matrix metalloproteinase-10) ja MMP7 (matrilysin, matrix metalloproteinase-7) kuuluvat matriksin metalloproteaasien (MMP) geeniperheeseen [17, 18]. MMP:t tuottavat soluväliainetta hajottavia entsyymeitä, ja ne osallistuvat kudosten muotoutumiseen sikiön kehityksen aikana, kasvuun ja verisuonten

muodostumiseen. Lisäksi niillä on tärkeä tehtävä kudosisvaurioiden parantumisen yhteydessä [19, s. 231–233]. MMP:n on todettu osallistuvan vahvasti myös kohdun limakalvon syklisiin kasvuvaiheisiin ja solukuolemiin. Kuukautiskierron vaiheissa eri MMP:ejä ilmennetään eri tavoin, MMP10:tä ja MMP7:ää ekspressoidaan erityisesti kuukautisten aikana [9, 20]. Lisäksi MMP7:n ei ole joidenkin tutkimusten mukaan todettu ilmentyvän muussa veressä kuin kuukautisveressä [21].

LEFTY2 koodaa proteiinia (left-right determination factor 2), jonka on todettu osallistuvan kuukautisvuotoon. Sitä ekspressoidaan kohdun limakalvon mesenkymaalisissa soluissa [22].

MMP10 monistui kaikista kuukautisverinäytteistä erittäin herkästi. Merkkien MMP7 ja LEFTY2 monistuminen korreloi selvemmin kiertopäivien (kp) määrään nähden. MMP 7 monistui lähes kaikista näytteistä vahvana, mutta MMP10:n ja MMP7:n suhde toisiinsa vaihteli näytteiden ja kiertopäivien välillä. LEFTY2 monistui maltillisemmin kuin MMP:t, ja se alkaakin joidenkin tutkimusten mukaan hävitä näytteistä kiertopäivien ylittäessä päivät 3–4 [6]. Koska tässä tutkimuksessa ei ollut käytettävissä tarpeeksi eri kiertopäivien näytteitä, ei varmoja johtopäätöksiä voida näiden perusteella tehdä. Mutta käytetyistä näytteistä oli nähtävissä saman henkilön kuukautisverinäytteessä ero kiertopäivä 1:n ja kiertopäivä 5:n välillä: kp1 LEFTY2 piikki monistui ja kp5 se oli kadonnut. Kuukautisverimerkeillä olisi siis mahdollista eritteen tunnistuksen lisäksi saada myös tietoa kuukautiskierron kiertopäivien määrästä, vastaavia tutkimuksia on julkaistu [23]. Tietoa voitaisiin hyödyntää esimerkiksi rikoksen tapahtuma-ajankohtaa selvittäessä.

5.3.4 Emätinerite/epiteelisolut

Emätinnäytteistä monistettiin neljä merkkiä yhteisreaktiossa. Käytetyt merkit olivat HBD1, MUC4 ja CYP2B7P1 sekä kontrollimerkki 18S-rRNA (Kuva 8).



Kuva 8. Kapillaarielektroforeesitulokset emätinnäytteelle.

HBD1 koodaa peptidiä (human beta-defensin-1), jolla on bakteereita tuhoava vaikutus [24]. Se huolehtii pääasiassa virtsa- ja sukupuolielinten epiteelien antimikrobisesta puolustuksesta [21].

MUC4 koodaa proteiinia (mucin 4), jolla on tärkeä rooli epiteelisolujen lisääntymisessä ja erilaistumisessa, ja sitä ilmentetään limakalvoilla. Se osallistuu solujen väliseen kiinnittymiseen estävänä tekijänä [25]. MUC4:n uskotaan olevan tärkein kohdunkaulakanavan puolustajista ulkopuolisia patogeenejä vastaan, sekä kontrolloivan sperman pääsyä kohtuun [21]. Musiinit kuuluvat glykoproteiineihin ja ovat siis ns. lima-aineita.

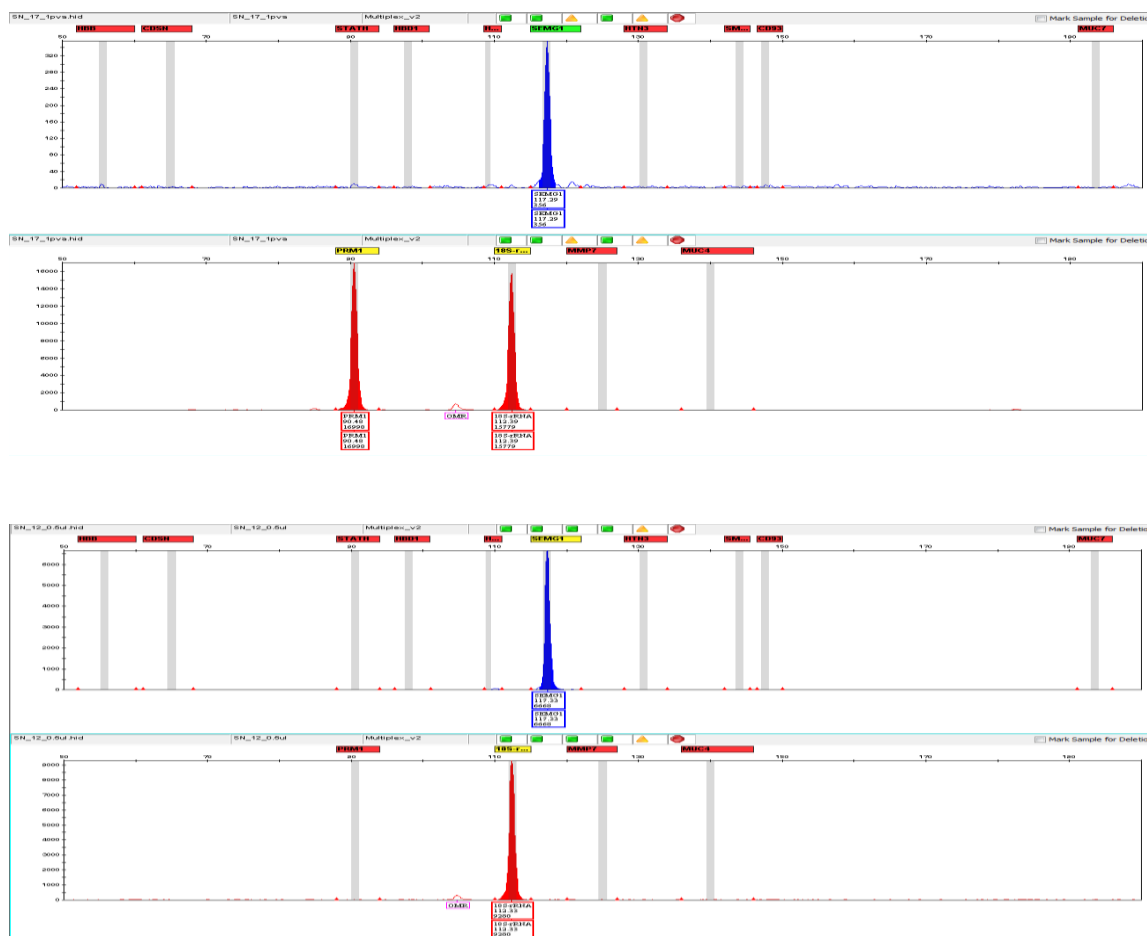
CYP2B7P1 (cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 7, pseudogene 1) kuuluu sytokromi P450 -geeniperheeseen. Sytokromit koodaavat entsyymeitä, jotka toimivat hapettavina katalyytteinä elimistön vierasainemetaboliassa. CYP2B7P1:n tarkemmasta roolista emättimen alueella ei löytynyt tietoa [26].

Kaikki valitut merkit monistuivat näytteistä vahvana. Tämä johtuu varmasti osittain siitä, että käytössä olleet näytteet sisälsivät niin paljon soluja, että useimmat niistä jouduttiin

laimentamaan luettavien tulosten saamiseksi. On raportoitu että MUC4:ää ei ehkä tuotettaisi menopausin ylittäneillä naisilta [27]. Tässä työssä olevista näytteistä ei havaittu vastaavaa, vaikka joukossa oli useampikin menopausin ohittanut näytteenantaja. Sen sijaan HBD1-piikki jäi kokonaan pois osasta näytteistä. Sen poisjäänti ei korreloinut suoraan ikään. Syy vaihteluun voisi löytyä esimerkiksi mikrobipuolustuksesta tai sen puutteeseen liittyvistä tekijöistä; asia vaatii kuitenkin lisätutkimuksia.

5.3.5 Siemenneste

Siemennestenäytteistä monistettiin kolme merkkiä yhteisreaktiossa. Käytetyt merkit olivat PRM1 ja SEMG1 sekä kontrollimerkki 18S-rRNA (Kuva 9).



Kuva 9. Kapillaarielektroforeesikuvat normaalista siemennesteestä (ylempi) ja vasktomianäytteestä (alempi).

PRM1 koodaa proteiinia (sperm protamine 1), jota tuotetaan kiveksissä ja joka osallistuu siittiötuotantoon [28]. SEMG1 koodaa puolestaan proteiinia (semenogelin-1), jota on runsaasti siemennesteessä. Sitä tuotetaan rakkularauhasessa [29]. Merkkejä valittaessa otettiin huomioon siittiöttömän siemennesteen esiintymismahdollisuus.

SEMG1 monistui erittäin tehokkaasti kaikista siemennesteistä. Näytteissä oli mukana 4 kpl vasktomianäytteitä, joiden siittiöttömyys oli varmistettu mikroskooppisesti. PRM1 monistui kaikista muista paitsi vasktomianäytteistä. Mukana oli yksi näyte, joka sisälsi erittäin vähän siittiöitä. Tästäkin näytteestä monistui matalahko PRM1-piikki. Käytettyjä merkkejä voidaan siis kuvata erittäin tehokkaiksi siemennestemerkeiksi. On kuitenkin suositeltavaa lisätä vielä yksi lisämerkki tulosten luotettavuuden takaamiseksi.

5.3.6 Sylki

Sylkinäytteistä monistettiin viisi merkkiä yhteisreaktiossa. Käytetyt merkit olivat STATH, HTN3, SMR3B ja MUC7 sekä kontrollimerkki 18S-rRNA (Kuva 10.)



Kuva 10. Kapillaarielektroforeesitulokset sylkinäytteelle.

Kaikki käytetyt merkit koodaavat proteiineja joita löytyy syljestä. STATH koodaa proteiinia (statherin), joka stabiloi sylkeä ja estää kalsiumfosfaattisuolojen saostumista. Sitä tuotetaan korvasylkirauhasissa ja alaleuan rauhasissa [30]. HTN3 koodaa syljen proteiineja (histatin-3), jotka toimivat esiasteena hampaiden proteiinipitoisille suoja-pinnoille. Niillä on myös antimikrobinen vaikutus [31]. SMR3B koodaa proteiinia (submaxillary gland androgen-regulated protein 3B), jota ilmennetään syljessä ja tuotetaan leuanalussylkirauhasissa [32]. MUC7 toimii suuonteloa suojaavana proteiinina (mucin 7), tuotetaan sylkirauhasissa [33]. Se kuuluu musiinina glykoproteiineihin.

Pääsääntöisesti merkit monistuivat hyvin, mutta yksikään valituista merkeistä ei monistunut jokaisesta näytteestä. Tuloksissa näkyi myös melko runsaasti epäspesifisiä piikkejä. Näihin voitaisiin kenties vaikuttaa PCR-ohjelmaa muokkaamalla. Voidaan myös pohtia jonkun merkin poisjättämistä. Näytteiden sisältämästä solumäärästä ei ole täyttä varmuutta, joskin kontrollimerkki 18S-rRNA monistui jokaisesta tutkitusta näytteestä.

5.3.7 Iho

Ihonäytteistä monistettiin neljä merkkiä yhteisreaktiossa. Käytetyt merkit olivat CDSN, LOR ja LCE1C sekä kontrollimerkki 18S-rRNA (Kuva 11).



Kuva 11. Kapillaarielektroforeesitulos ihonäytteelle.

Kaikki valitut merkit koodaavat ihon uloimman kerroksen proteiineja, joilla on merkitystä ihon uusiutumisessa. CDSN koodaa proteiinia (corneodesmosin), joka on tärkeä ihon eheydelle ja osallistuu ihon hilseilyyn [34]. LOR koodaa ihon uloimman sarveissolukerroksen proteiinia (loricrin), sitä ekspressoidaan keratinosyyttisoluissa [35]. LCE1C koodaa proteiineja (late cornified envelope protein 1C), jotka ovat sarveissolukerroksen solukuorien esiasteita [36].

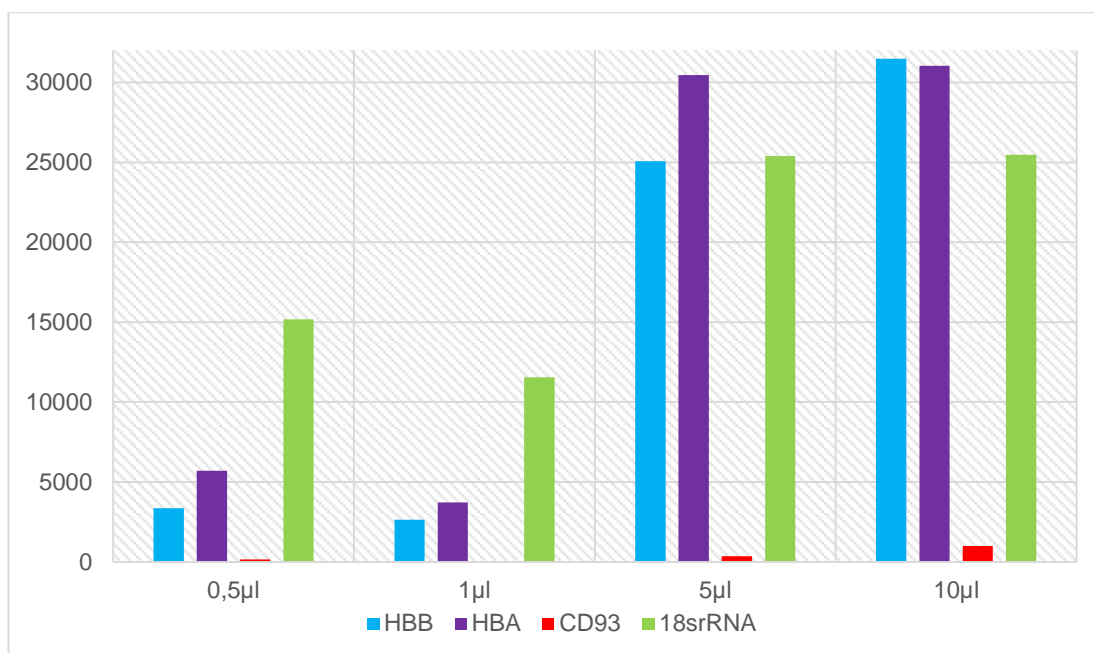
Ihonäytteiden tiedettiin olevan haastavia jo julkaisujen perusteella. On tiedossa että myös ihosta saaduissa DNA-tuloksissa on yksilöiden välisiä eroja. Vaikutusta on myös sillä, mistä osasta vartaloa ihonäytteet on otettu: käsien ja jalkapohjien iho on erilaista verrattuna ns. karvaiseen ihoon, jota on muussa kehossa. [7] Tässä työssä ihonäytteet olivat käsivarresta otettuja. Noin puolesta iho-näytteitä saatiin monistettua RNA-tulokset. Tulokset vaihtelivat myös näytteenottajien välillä, joten voidaan pohtia, onko näytteenotto sujunut täysin annettujen ohjeiden mukaisesti. Osasta näytteistä ei onnistuttu monistamaan edes kontrollimerkkiä 18S-rRNA, joten näissä näytteissä on ollut erittäin vähän soluja tai sitten niitä ei ole ollut ollenkaan.

Tuloksiin voivat vaikuttaa myös esim. kosmeettiset aineet: yhden analysoidun näytteen tiedettiin sisältävän itsestään ruskettavaa voidetta, eikä näytteestä saatu monistumaan yhtäkään merkkiä, ei edes kontrollimerkkiä. Tapauksen näytteenotto oli tehty perusteellisesti. Ihomerkit vaativat ehdottomasti lisää tutkimuksia. Kosmeettisten

aineiden lisäksi tulisi tutkia myös muista kehonosista, erityisesti käsistä otettuja ihonäytteitä.

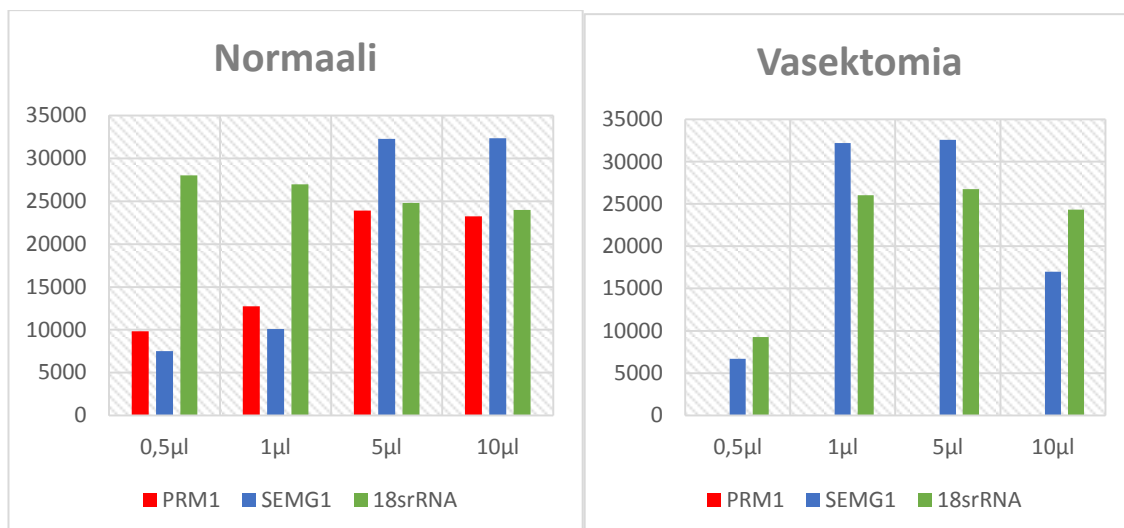
5.3.8 Laimennossarja

Laimennossarjalla testattiin menetelmän herkkyyttä veri-, siemenneste- ja sylkinäytteillä. Testatut volyymit olivat 0,5 µl, 1 µl, 5 µl ja 10 µl. Kaikista verinäytteistä saatiin tulokset (Kuva 12). 1 µl:n näytteestä ei monistunut CD93-piikkiä, mutta se johtunee lähinnä sattumasta, eli siitä ettei kyseiseen näytteeseen ole osunut riittävästi valkosoluja.



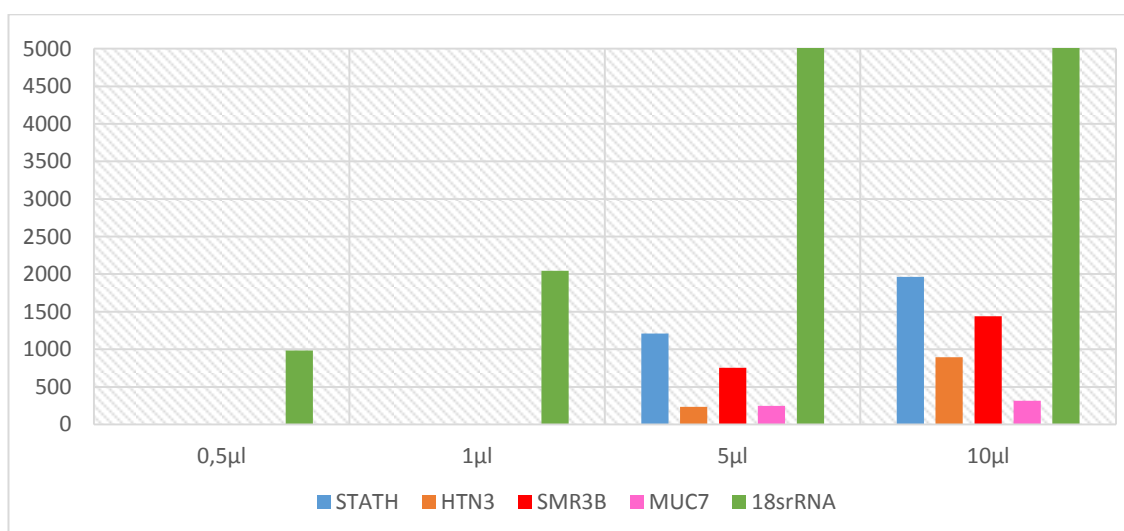
Kuva 12. Veren laimennossarja-tulokset kapillaarielektroforeesipiikkien perusteella.

Myös siemennestenäytteistä, sekä normaalista että vasektomianäytteestä, saatiin määritettyä hyvät tulokset (Kuva 13). Siemennestenäytteet ovat erittäin viskooseja, joten pienien määrien pipetointi on haastavaa.



Kuva 13. Siemennestenäytteiden tulokset kapillaarielektroforeesipiikkien perusteella.

Sylkinäytteet eivät osoittautuneet yhtä herkiksi kuin veri- ja siemennestenäytteet. Tuloksia ei saatu 0,5 µl:n ja 1 µl:n näytteistä, mutta 5 µl:n ja 10 µl näytteistä saatiin monistettua kaikki merkit (Kuva 14). 5 µl:n tulokset olivat kuitenkin sen verran vahvat, että voidaan olettaa pienemmänkin näytemäärän (esim. 2,5 µl) riittävän tulosten, ainakin osittaisten, saamiseen.

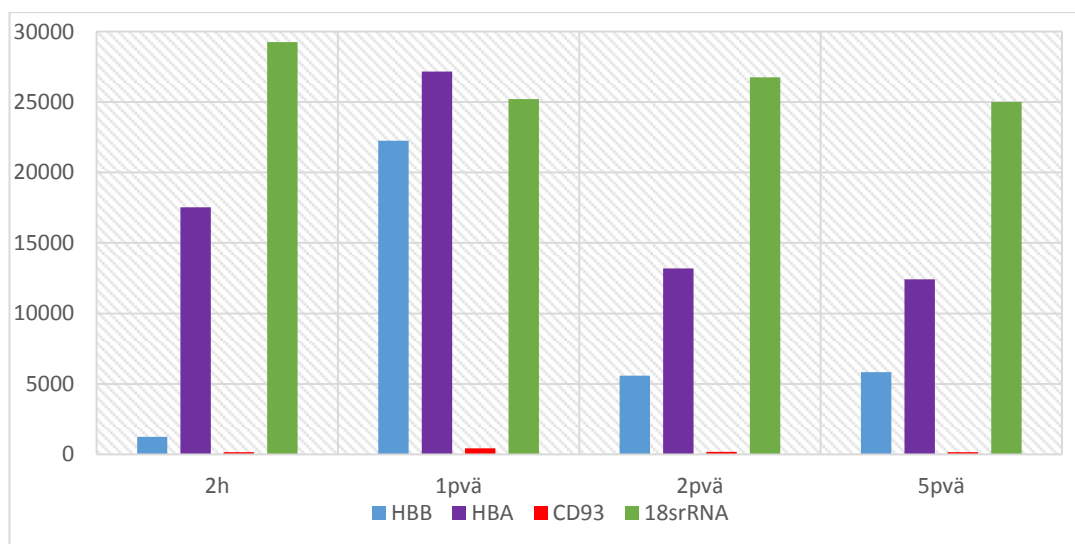


Kuva 14. Sylkinäytteen tulokset kapillaarielektroforeesipiikkien perusteella.

Tämä herkkyydesti osoitti hyvin, että RNA:ta on mahdollista eristää hyvin pienistäkin näytemääristä. Se tukee myös sitä oletusta, että käytetty DNA/RNA -yhteiseristyskitti toimii vähäisellekin näytteelle.

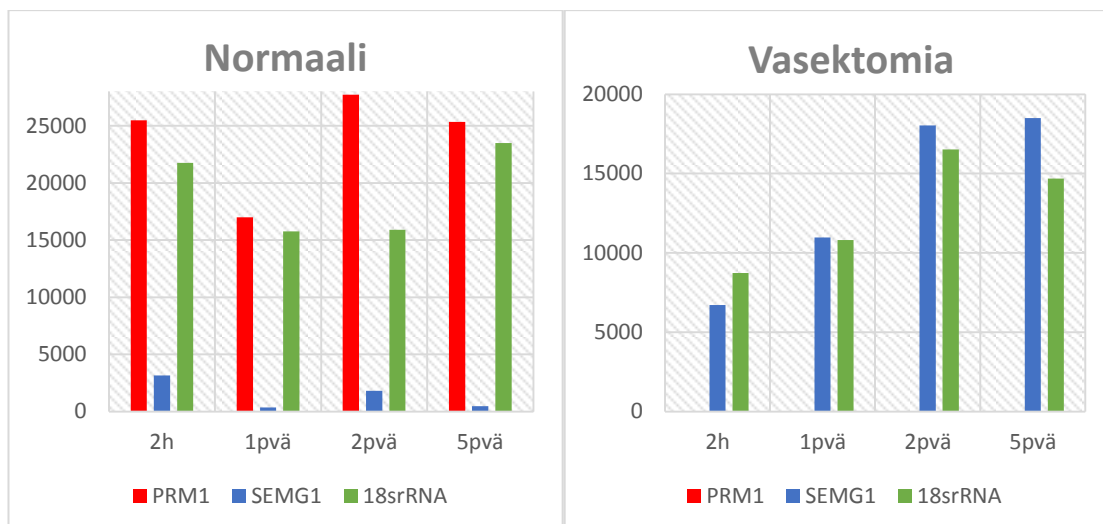
5.3.9 Aikasarja

Aikasarjalla testattiin, kuinka nopeasti RNA hajoaa veri- ja siemennestenäytteestä huoneenlämmössä ja onko esimerkiksi kuivuneista tahroista mahdollista eristää RNA:ta. RNA:n hajoamistietojen perusteella voitiin olettaa, ettei näytteistä saada monistettua haluttuja piikkejä enää lyhyenkään ilma- ja pölyaltistuksen jälkeen. Verinäytteistä saatiin kuitenkin tulokset jokaisesta merkistä, myös viiden päivän seisotuksen jälkeen (Kuva 15).



Kuva 15. Verinäytteen tulokset ajan suhteessa kapillaarielektroforeesipiikkeihin.

Myös siemennestenäytteiden merkit monistuivat erittäin tehokkaasti seisotusten jälkeen (Kuva 16). Vasektomianäytteessä oli nähtävissä jopa piikkien voimistumista ajan kuluessa, mikä voi johtua esimerkiksi näytteen konsentroimisesta kuivuttuaan.



Kuva 16. Aikasarjan siemennestenäytteiden tulokset kapillaarielektroforeesipiikkien perusteella.

RNA on osoittautunut mainettaan kestävämmäksi molekyyliksi. Sitä on onnistuttu eristämään jopa vuosia vanhoista näytteistä, verimerkkejä on saatu monistettua yli kaksikymmentä vuotta vanhoista veritahroista [37]. Tässä työssä saadut tulokset tukevat näitä tuloksia. Tieto on erittäin tärkeä, ja näin ollen myöhemminkin löytyneitä tahroja voitaisiin analysoida ja saada niiden kautta lisätietoa.

5.3.10 Multiplex

Multiplex-testauksessa kaikki 19 merkkiä pyrittiin monistamaan samassa reaktiossa. Kaikista näytematriiseista testattiin viisi näytettä, joista oli saatu hyvät tulokset matriisikohtaisissa reaktioissa. Testatuissa multiplex-reaktioissa herkkyys laski selvästi matriisikohtaisiin reaktioihin verrattuna, kapillaarielektroforeesipiikkien korkeus oli joissakin näytteissä vain kymmenesosa. Lisäksi reaktioissa monistui jonkin verran epäspesifejä piikkejä, ja osa merkeistä monistui myös muissa kuin niille kohdistetuissa matriiseissa (Taulukko 5).

Taulukko 5. Testatut multiplex-reaktiot.

	HBB	HBA	CD93	MMP10	MMP7	LEFTY2	HBD1	MUC4	CYP2B7P1	PRM1	SEMG1	STATH	HTN3	SMR3B	MUC7	CDSN	LOR	LCE1C
V_5.	1	1	1	1														
V_42.	1		1								1							
V_73.	1			1													1	
V_74.	1		1	1														
V_78.	1	1	1															
KK_1.			1	1	1	1										1	1	
KK_2.	1		1	1	1	1	1	1	1							1	1	
KK_3.				1	1													
KK_5.	1		1	1	1		1	1	1							1	1	1
KK_77.			1	1	1	1	1	1	1							1	1	
E_40.				1				1	1							1	1	1
E_41.				1	1		1	1	1								1	1
E_51.				1				1	1								1	
E_57.				1	1		1	1	1							1	1	
E_61.			1	1	1		1	1	1							1	1	
SN_14.										1	1							
SN_15.	1			1						1								
SN_19.				1						1	1							1
SN_26.				1						1	1							1
SN_72.							1				1							1
S_11.				1				1				1	1	1	1	1	1	
S_12.			1	1				1	1			1	1	1	1	1	1	1
S_16.				1								1			1			1
S_30.				1				1				1		1				1
S_42.			1	1				1				1	1	1		1	1	1
I_11.				1	1					1						1		1
I_12.				1						1						1	1	
I_16.																	1	1
I_30.																	1	1
I_53.																	1	

Verinäytteissä HBB piikki monistui kaikista testatuista näytteistä, mutta HBA piikki ei monistunut kolmesta näytteestä ja CD93 merkki jäi pois yhdestä näytteestä. Kuukautisveren merkki MMP10 monistui kolmesta verinäytteestä, jotka kaikki olivat peräisin naispuoliselta näytteenantajalta. Siemennestänäytteen SEMG1 piikki monistui yhdestä ja ihomerkki LOR samoin yhdestä verinäytteestä, molemmat näytteet naispuolisesta henkilöstä. Näyte josta ihomerkki LOR monistui, oli otettu sormenpäästä, joten mahdollinen ihokontakti voi selittää monistumisen.

Kuukautisverinäytteistä monistui samat merkit kuin matriisikohtaisissa analyyseissä, tosin matalampina. Verimerkeistä HBB monistui kahdesta ja CD93 neljästä näytteestä. Kolme emätinmerkkiä (HBD1, MUC4 ja CYP2B7P1) monistui neljästä, ihomerkit CDSN ja LOR neljästä sekä ihomerkki LCE1C yhdestä näytteestä. Emätin- ja ihomerkkien monistuminen selittyy sillä, että kuukautisverinäytteet on otettu emättimestä ja pumpulipuikko on ollut samalla ihokontaktissa.

Emätinnäytteet monistuivat samoin kuin matriisikohtaisissa reaktioissa, mutta nekin matalampina. Yhdestä näytteestä monistui verimerkki CD93, kuukautisverimerkeistä MMP10 monistui jokaisesta viidestä ja MMP7 kolmesta näytteestä. Ihomerkeistä CDSN monistui kolmesta, LOR viidestä ja LCE1C kahdesta näytteestä. Ihomerkit monistuivat

näytteistä luultavammin siksi, että näytteet on otettu emättimestä, ja ihokosketus on täten ollut mahdollinen.

Siemennestenäytteistä yhdestä näytteestä jäi monistumatta SEMG1, lisäksi siemennestenäytteestä, jossa tiedettiin olevan erittäin pieni siittiökonsentraatio, jäi monistumatta PRM1. Tämä merkki monistui matriisikohtaisessa reaktiossa, joten tulos kertoo multiplex-reaktion alhaisemmasta herkkyydestä. Yhdestä näytteestä monistui verimerkki HBB, kuukautisverimerkki MMP10 monistui kolmesta, emätinmerkki HBD1 yhdestä ja ihomerkki LCE1C kolmesta näytteestä. Verimerkin monistumiselle mahdollinen selitys voisi olla se, että siemennestenäytteessä olisi vähäinen määrä verta, emätinmerkille mahdollinen aikaisempi yhdyntä ja ihomerkillä ihokontakti näytteen antamisen yhteydessä.

Sylkinäytteistä kolmesta näytteestä jäi monistumatta osa sylkimerkeistä, vaikka nämä olivat monistuneet matriisikohtaisessa analyysissä. Kahdesta sylkinäytteestä monistui verimerkki CD93, kuukautisverimerkki MMP10 monistui kaikista viidestä näytteestä (neljä näytteistä peräisin miespuoliselta ja yksi peräisin naispuoliselta näytteenantajalta), emätinmerkeistä MUC4 neljästä (kolme mieheltä, yksi naiselta) ja CYP2B7P1 yhdestä näytteestä (miesnäyte). Ihomerkkejä monistui jokaisesta sylkinäytteestä. Ihomerkkien monistuminen selittyy näytteenotossa tapahtuneella ihokontaktilla, sylkinäytteet kerättiin kielen päältä.

Ihonäytteet monistuivat melko eri tavoin kuin matriisikohtaisissa analyyseissä. Kolmesta analysoidusta näytteestä matriisikohtaisilla reaktioilla saatiin monistettua kaikki ihomerkit, mutta multiplex-reaktiona niistä monistui ainoastaan osa. Lisäksi kahdesta näytteestä matriisikohtaisesti monistui kaksi kolmesta merkistä, kuten myös multiplex-reaktiossa, mutta eri kombinaationa. Kuukautisverimerkeistä MMP10 monistui kahdesta ja MMP7 yhdestä näytteestä (kaikki peräisin miespuolisilta näytteenantajilta), ja siemennestemerkki PRM1 kahdesta näytteestä (molemmat miesnäytteitä).

Multiplex-reaktioiden optimointiin tulisi saada sellaisia näytteitä, joiden ei tiedetä sisältävän mitään muita kuin tutkittavaa matriisia. Valtaosassa tässä työssä analysoitujen näytteiden sisällöstä ei ole sen suhteen aivan varmaa tietoa. Lisätulosten perusteella voitaisiin nähdä oikeasti ”väärät reagoinnit” ja täten osa merkeistä olisi mahdollista valita uudelleen. Näissä tuloksissa tulee huomioida että kustakin matriisista

analysoitiin ainoastaan viisi näytettä, tässä työssä ei ollut mahdollista testata reaktioita enempää. Multiplex-reaktioiden suunnittelu vaatii ehdottomasti lisää optimointia. Käytetyt alukkeet saattavat myös olla sekvensseiltään samankaltaisia, ja täten niiden on mahdollista tarttua toisiinsa. PCR-olosuhteilla voidaan mahdollisesti lisätä alukkeiden spesifisyyttä, esimerkiksi annealing-lämpötilan nostolla tai $MgCl_2$:n konsentraatioilla tiedetään olevan vaikutusta.

Suurelle osalle merkeistä on julkaistu reagointia muihin matriiseihin, mutta tulokset ovat olleet melko ristiriitaisia. Esimerkiksi tässäkin työssä käytetyissä kuukautisveren merkeistä on julkaistu tuloksia, joiden mukaan niitä ilmennetään lähes kaikissa muissa matriiseissa [10]. MMP10:n kohdalla tämä näkyikin melko selvästi. Ottaen huomioon MMP10:n moninaiset tehtävät soluissa (esim. kasvu, erilaistuminen, kudოსvaurioiden paraneminen), tätä voidaan pitää melko luonnollisena asiana, mutta samalla voidaan pohtia, onko merkki lainkaan sovelias identifioimaan jotain tiettyä eritettä, vaikka se tehokkaasti tästä monistuisikin.

On kuitenkin kyettävä ymmärtämään myös se tosiasia, että tahroissa/eritteissä on harvoin kyse ainoastaan yhdestä matriisista. Näytteissä on yleensä aina mukana myös muiden matriisien soluja, ja erityisesti rikospaikkänäytteet voivat olla usean eri solutyypin ja henkilön sekoitus. Nämä seikat huomioon ottaen monet merkit voidaan nähdä erittäin herkkinä indikaattoreina hyvinkin pienille solumäärille.

5.3.11 Tulosten tulkinta kudostyyppien päättelämiseksi

Useissa julkaisuissa on pohdittu RNA-tulosten tulkintaa ja täysin yhtenäistä linjaa etsitään yhä [8; 9; 38; 39; 40]. Yhtenäinen tulkinta on erityisen tärkeää puhuttaessa rikospaikkänäytteistä ja tulosten todistusvoimasta. Tässä työssä, kuten myös esimerkiksi EDNAP:in tutkimuksissa, on tulkintana käytetty menetelmää, jossa merkki kirjataan havaituksi, mikäli se detektoidaan oikean kokoisena ja riittävän korkeana. Saadut tulokset prosentuaalisina osuuksina kaikista kyseisien kudostyyppien näytteistä on esitetty taulukossa 6.

Taulukko 6. Kaikki tulokset prosentuaalisesti esitettynä.

		Veri			Kuukautisveri			Emätin			Siemenneste		Sylki				Iho		
	<i>n</i> henkilöä	HBB	HBA	CD93	MMP10	MMP7	LEFTY2	HBD1	MUC4	CYP287P1	PRM1	SEMG1	STATH	HTN3	SMR3B	MUC7	CDSN	LOR	LCE1C
Veri	12	100 %	100 %	75 %															
Kuukautisveri	10				100 %	85 %	70 %												
Emätin	20							60 %	97,5 %	100 %									
Siemenneste	20 (4 vasek.)										80 %	100 %							
Sylki	10(M) + 10(F)												95 %	85 %	95 %	85 %			
Iho	10(M) + 10(F)																45 %	55 %	50 %

Tulosten tulkintaan käytetyillä tilastollisilla menetelmillä arvoidaan havaittuja merkkien monistumia. Julkaisuissa on käytetty esimerkiksi " $x = n/2$ " laskentamenetelmää [38] sekä numeraalista pisteytysmenetelmää [10]. Laskentatavassa " $x = n/2$ " " x " kertoo havaittujen piikkien ja " n " taas kaikkien teoreettisesti mahdollisten piikkien määrän. Arvo " n " määräytyy huomioiduista RNA-profiileista sekä matriisikohtaisten merkkien lukumäärästä. Tulokset voidaan arvottaa kuuteen eri kategoriaan. Kolme tärkeintä luokkaa ovat "observed" (havaittu) jos $x \geq n/2$, "not observed" (ei havaittu) jos $x = 0$ ja "sporadically observed" (osittain havaittu) jos $0 < x < n/2$. Numeraalisessa pisteytysmenetelmässä havaitut piikit arvoidaan siten että suurin arvo 100 annetaan merkkille, joka havaitaan sille tarkoitettussa matriisissa. Merkin pistemäärä laskee, mikäli sitä esiintyy muissa matriiseissa [10]. Myös sisäisillä kontrollimerkkeillä voidaan saada lisäarvoa: eri kontrollimerkkejä ilmennetään eri soluissa eri tavoin [38]. Uusimpina menetelminä on kehitelty erilaisia todennäköisyyksiin perustuvia laskentamalleja kuten esimerkiksi "naïve Bayes" ja multinominaalinen logistinen regressio (multinomial logistic regression) [40].

Käytetäänpä RNA-tuloksia analysoitaessa mitä menetelmää tahansa, ei voida liikaa korostaa DNA-tulosten merkitystä samoista näytteistä. Mikäli kysymyksessä on rikospaikkänäyte, pelkkä RNA-tulos ei yksin riitä. Tutkittavan eritteen laadun selvittyä on sille tunnistettava myös omistaja. Koska kyseessä voi hyvin todennäköisesti olla sekatahra, josta löytyy useamman henkilön eritteitä ja/tai montaa eri eritettä, tulee matriisikohtaisia RNA-merkkejä olla riittävän monta, jotta niiden esiintyminen sekä merkkien monistumisen suhde voidaan riittävällä varmuudella todeta. Suhdelukujen

vertaamista ei tosin voida toistaiseksi pitää täysin luotettavana mittarina mikäli kyseessä on monen eri eritteen sekatahra; tämä asia vaatii lisätutkimuksia. Ilmennettävien RNA-merkkien määrät vaihtelevat myös suuresti eri yksilöiden ja eri solujen välillä, ja monet biologiset ja fysiologiset tekijät vaikuttavat niihin [38]. Tuloksia tulkittaessa tuleekin olla riittävä kokemus ja näkemys merkeistä sekä tietoisuus siitä, mikä kunkin merkin toiminto on soluissa.

5.4 DNA

5.4.1 DNA-kvantitointi

Osasta DNA-eristeistä määritettiin DNA-pitoisuus Quantifiler Human DNA Quantification -kitillä. Kvantitointiin käytettiin herkkyys- ja aikasarjan näytteitä, sekä muutamia näytteitä kaikista tutkituista matriiseista, tulokset on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 7. Kvantitointitulokset DNA ng/μl.

Veri_0.5ul	0,009
Veri_1ul	0,012
Veri_5ul	0,042
Veri_10ul	0,109
Vasektomia_0.5ul	
Vasektomia_1ul	0,008
Vasektomia_5ul	0,002
Vasektomia_10ul	0,003
Siemenneste_0.5ul	0,096
Siemenneste_1ul	0,205
Siemenneste_5ul	1,244
Siemenneste_10ul	2,682
Sylki_0.5ul	0,012
Sylki_1ul	0,027
Sylki_5ul	0,186
Sylki_10ul	0,406
Veri_2h	0,518
Veri_1pva	0,482
Veri_2pva	0,230
Veri_5pva	0,444
Vasektomia_2h	0,008
Vasektomia_1pva	0,012
Vasektomia_2pva	0,004
Vasektomia_5pva	0,014
Siemenneste_2h	0,176
Siemenneste_1pva	0,232
Siemenneste_2pva	0,298
Siemenneste_5pva	0,215
Emätin	14,347
Emätin	8,625
Emätin	12,921
Kuukautisveri	10,810
Kuukautisveri	3,830
Kuukautisveri	11,797
Iho	0,003
Iho	0,004
Iho	0,001
ER-0_3_11	
ER-0_3_11	
ER-0_14_11	
ER-0_14_11	

Kvantitointitulokset korreloivat melko hyvin RNA-tulosten kanssa, eli näytteistä joista saatiin eristettyä runsaasti DNA:ta, saatiin myös RNA:ta. Lisäksi esimerkiksi herkkyysarjan tulokset olivat kohtalaisen lineaariset näytemäärän suhteen. Emätin-, kuukautisveri- ja normaalit siemennestenäytteet sisälsivät runsaasti DNA:ta, kun taas vasektomianäytteistä ei DNA:ta saatu eristettyä. Myöskään testatuissa ihonäytteissä ei saatu eristettyä havaittavia määriä DNA:ta. Laboratorion suorittamassa GlobalFiler-kitin validoinnissa näytteistä, jotka sisälsivät 0,016 ng/μl DNA:ta, on saatu määritettyä lähes täydellinen DNA-profiili. Perusmääryksiin käytettävä DNA:n määrä on 0,5–2 ng/μl, eli monikymmenkertainen.

5.4.2 GlobalFiler

Jokaisesta matriisista monistettiin näytteitä GlobalFiler-kitillä. Monistukseen käytettiin myös laimennos- ja aikasarjan näytteitä. Tulokset korreloivat kvantitoinnissa havaittujen DNA-pitoisuuksien kanssa. Verestä, kuukautisverestä, emätineritteestä ja normaalista siemennesteestä saatiin määritettyä kaikki kitin sisältämät merkit, syljestä monistus onnistui osittain. Iho- ja vasektomianäytteistä ei saatu tuloksia.

6 Yhteenveto

Tämän työn tarkoituksena oli pystyttää menetelmä, jolla voidaan tunnistaa rikostapauksissa taltioituja tyypillisimpiä eritteitä mRNA-merkkien avulla. Tärkeänä osana työtä oli saada eristettyä RNA ja DNA samanaikaisesti. Käytetty DNA/RNA -yhteiseristyskitti toimi hyvin analysoiduille näytteille. Laimennossarjan perusteella pienistäkin veri-, siemenneste- ja sylkinäyttemääristä saatiin monistettua valittuja merkkejä. Erityisen herkästi monistuivat veri ja siemenneste. Aikasarja puolestaan osoitti, että RNA säilyy eritteissä luultua pidempiä aikoja, ja veri- ja siemennestenäytteistä pystyttiin monistamaan halutut merkit vielä viiden päivän seisotuksen jälkeenkin. RNA onkin osoittautunut luultua vakaammaksi molekyyliksi. Suurimmasta osasta näytteistä saatiin myös DNA:ta riittävästi yksilöntunnistusta varten.

Kvantitointiin käytetty Agilentin laite ja käytetyt kvantitointikitit eivät osoittautuneet käyttökelpoisiksi RNA-kvantitointimenetelmiksi tämän tyyppisille näytteille. Tämä vaatii vielä lisää pohdintaa, koska kvantitointi olisi erittäin hyödyllinen osa menetelmää jatkoanalyysien kannalta ja siihen tulisikin löytyä joku herkempi menetelmä.

Matriisikohtaiset PCR-reaktiot toimivat hyvin, erityisesti veri, kuukautisveri, emätinerite sekä siemenneste. Sylki- ja iho-monistusreaktiot vaativat vielä lisää optimointia. Jos lähtökohtana pidetään sitä, että kustakin matriisista tulisi olla ainakin kolme monistettavaa merkkiä tulosten luotettavuuden säilyttämiseksi, voitaisiin veren monistusreaktioiden merkki CD93 ja kuukautisveren MMP10 korvata joillakin toisilla merkeillä. Siemennestenäytteiden kohdalla kahden nyt hyvin tehokkaasti monistuvan merkin rinnalle voitaisiin lisätä vielä yksi merkki, kun taas sylkinäytteiden neljästä merkistä kenties yksi voitaisiin karsia. Ihon merkit tarvitsevat eniten lisää tutkimusta. Multiplex-reaktiot vaativat myös lisää optimointia, erityisesti alhaisempi herkkyystaso ja epäspesifi monistuminen matriisikohtaisiin reaktioihin nähden kaipaavat lisää selvitystä.

Lisätutkimuksia voitaisiin tehdä myös esimerkiksi eri kankaiden laadun ja kosmeettisten aineiden vaikutuksesta tahroihin. Myös kuukautisveren mahdollisesti antama lisäinformaatio esimerkiksi kiertopäivistä voisi tuoda huomattavasti lisäarvoa tutkimuksille. Siemennestenäytteiden antama tieto puolestaan siitä, onko kysymyksessä siittiöitä sisältämä näyte vai ei, saattaa olla tekijää mietittäessä hyvinkin

oleellinen tieto. Yhteinen linja tulosten tulkinnalle on myös tärkeää. Tulkinta vaatii tulkitsijalta kokemusta, tietoa merkeistä ja niiden toiminnoista soluissa, sekä DNA- ja RNA-analyyseistä saatujen tulosten yhdistämistä.

Tässä työssä käytetyt näytteet olivat pääasiassa hyvälaatuisia ja tuoreita, toisin kuin valtaosassa varsinaisia rikospaikkänäytteitä. Aikasarjan tulokset tosin tukevat sitä, että RNA:ta on mahdollista eristää ja analysoida pidempäänkin seisoneista näytteistä. Tulee kuitenkin huomioida, että kysymyksessä ovat biologiset näytteet, eikä niiden toimivuutta voida koskaan aivan täysin taata tai ennustaa. RNA:ssa on olemassa vielä paljon tekijöitä joista ei tiedetä, ja siihen vaikuttavat monet sisäiset ja ulkoiset tekijät. Mutta olemassa olevien tietojen ja tässäkin työssä saatujen tulosten valossa voidaan uskoa, että RNA tuo ehdottomasti tulevaisuudessa lisäarvoa monille tutkimuksille ja siitä kehittyy hyvä työkalu forensisiin menetelmiin. Jo nyt laajasti käytetyt menetelmät laitteistoineen, kuten PCR ja kapillaarielektroforeesi, voidaan täysin valjastaa RNA-tutkimuksiin. Siirtyminen RNA-työskentelyyn DNA-laboratoriossa vaatii siten enemmän ajattelutavan ja käytäntöjen muutosta kuin kalliita investointeja. Erityisesti siemennestemerkkien herkkyydellä voisi olla suuri merkitys raikaustutkimuksissa. Testattuja menetelmiä on mahdollista laajentaa myös muihin kudoksiin.

Lähteet

- 1 Rio D.C., Ares M. Jr., Hannon G.J. & Nilsen T.W. 2011. RNA a Laboratory Manual.
- 2 Solunetti, mukaillen, http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/rna_lajit/2/. Luettu 4.3.2016.
- 3 Haas C., Hanson E., Bär A., *et al.*, mRNA profiling for the identification of blood - Results of a collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 5 (2011), p. 21–26.
- 4 Haas C., Hanson E., Anjos M.J., *et al.*, RNA/DNA co-analysis from blood stains – Results of a second collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 6 (2012), p. 70–80.
- 5 Haas C., Hanson E., Anjos M.J., *et al.*, RNA/DNA co-analysis from human saliva and semen stains – Results of a third collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 7 (2013), p. 230–239.
- 6 Haas C., Hanson E., Anjos M.J., *et al.*, RNA/DNA co-analysis from human menstrual blood and vaginal secretion stains: Results of a fourth and fifth collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 8 (2014), p. 203–212.
- 7 Haas C., Hanson E., Baneman R., *et al.*, RNA/DNA co-analysis from human skin and contact traces – results of a sixth collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 16 (2015), p. 139–147.
- 8 Van den Berge M., Carracedo A., Gomes I., *et al.*, A collaborative European exercise on mRNA-based body fluid/skin typing and interpretation of DNA and RNA results. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 10 (2014), p. 40–48.
- 9 Lindenberg A., De Pagter M., Ramdayal G., *et al.*, A multiplex (m)RNA-profiling system for the forensic identification of body fluids and contact traces. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 6 (2012), p. 565–577.
- 10 Roeder A.D. & Haas C., mRNA profiling using a minimum of five mRNA markers per body fluid and a novel scoring method for body fluid identification. *Int. J Legal Med.* (2013), 127, p. 707–721.
- 11 Haas C., Hanson E., Kratzer A., *et al.*, Selection of highly specific and sensitive mRNA biomarkers for the identification of blood. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 5 (2011), p. 449–458.

- 12 Juusola J. & Ballantyne J., mRNA Profiling for Body Fluid Identification by Multiplex Quantitative RT-PCR. *J. Forensic Sci.* (2007) Vol. 52, No. 6.
- 13 Grabmüller M., Madea B. & Courts C., Comparative evaluation of different extraction and quantification methods for forensic RNA analysis. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 16 (2015), p. 195–202.
- 14 The UniProt Knowledgebase. <http://www.uniprot.org/uniprot/P68871>. Luettu 2.4.2016.
- 15 The UniProt Knowledgebase. <http://www.uniprot.org/uniprot/P69905>. Luettu 2.4.2016.
- 16 The UniProt Knowledgebase. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9NPY3>. Luettu 2.4.2016.
- 17 The UniProt Knowledgebase. <http://www.uniprot.org/uniprot/P09238>. Luettu 2.4.2016.
- 18 The UniProt Knowledgebase. <http://www.uniprot.org/uniprot/P09237>. Luettu 2.4.2016.
- 19 Heino J. & Vuento M. 2014. *Biokemian ja solubiologian perusteet*. Sanoma Pro Oy.
- 20 Goffin F., Munaut C., Franken F., *et al.*, Expression Pattern of Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Matrix-Metalloproteinases in Cycling Human Endometrium. *Biology of Reproduction* 69 (2003), p. 976–984.
- 21 Juusola J. & Ballantyne J., Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids. *Forensic Sci. Int.* 152 (2005), p. 1–12.
- 22 The UniProt Knowledgebase. <http://www.uniprot.org/uniprot/O00292>. Luettu 3.4.2016.
- 23 Haas C., Klessner B., Maake C., *et al.*, mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 3 (2009), p. 80–88.
- 24 The UniProt Knowledgebase. <http://www.uniprot.org/uniprot/P60022>. Luettu 4.4.2016.
- 25 The UniProt Knowledgebase. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q99102>. Luettu 4.4.2016.

- 26 Hanson E.K., Ballantyne J. & Highly specific mRNA biomarkers for the identification of vaginal secretions in sexual assault investigations. *Science and Justice* 53 (2013), p. 14–22.
- 27 Hadžić G., Lukan A. & Drobnič K., Practical value of the marker MUC4 for the identification of vaginal secretion in penile swabs. *Forensic Sci. Int.: Genet. Suppl. Ser.* 3 (2011), p. e222–e223.
- 28 The UniProt Knowledgebase. <http://www.uniprot.org/uniprot/P04553>. Luettu 4.4.2016.
- 29 The UniProt Knowledgebase. <http://www.uniprot.org/uniprot/P04279>. Luettu 4.4.2016.
- 30 The UniProt Knowledgebase. <http://www.uniprot.org/uniprot/P02808>. Luettu 4.4.2016.
- 31 The UniProt Knowledgebase. <http://www.uniprot.org/uniprot/P15516>. Luettu 4.4.2016.
- 32 The UniProt Knowledgebase. <http://www.uniprot.org/uniprot/P02814>. Luettu 4.4.2016.
- 33 The UniProt Knowledgebase. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8TAX7>. Luettu 4.4.2016.
- 34 The UniProt Knowledgebase. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q15517>. Luettu 4.4.2016.
- 35 The UniProt Knowledgebase. <http://www.uniprot.org/uniprot/P23490>. Luettu 4.4.2016.
- 36 The UniProt Knowledgebase. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q5T751>. Luettu 4.4.2016.
- 37 Kohlmeier F. & Schneider P.M., Successful mRNA profiling of 23 years old blood stains. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 6 (2012), p. 274–276.
- 38 Lindenberg A., Maaskant P. & Sijen T., Implementation of RNA profiling in forensic casework. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 7 (2013), p. 159–166.
- 39 Sijen T., Molecular approaches for forensic cell type identification: On mRNA, miRNA DNA methylation and microbial markers. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 18 (2015), p. 21–32.

- 40 De Zoete J., Curran J. & Sjerps M., A probabilistic approach for the interpretation of RNA profiles as cell type evidence. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 20 (2016), p. 30-44.

Näytteen kulku kaaviona

